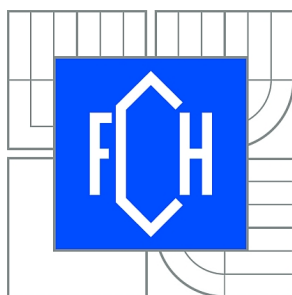




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM REAKTIVITY KATIONAKTIVNÍHO BIOPOLYMERU POMOCÍ JEDNODUCHÝCH DIFÚZNÍCH TECHNIK

STUDY ON REACTIVITY OF CATIONIC BIOPOLYMER BY SIMPLE DIFFUSION TECHNIQUES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

BARBORA TESAŘOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JIŘÍ SMILEK

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0944/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Barbora Tesařová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Jiří Smilek	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Studium reaktivity kationaktivního biopolymeru pomocí jednoduchých difúzních technik

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši se zaměřením na metody experimentálního studia reaktivity biopolymerů.
2. Na základě literární rešerše vybrat vhodnou dvojici modelového biopolymeru a difúzního média (organické barvivo) a charakterizovat ji standardními fyzikálně-chemickými metodami.
3. Pro zvolené kombinace biopolymer/difúzní sonda stanovit zvolené difúzní charakteristiky (difúzní koeficienty, čas průchodu).
4. Diskutovat vliv interakce mezi biopolymerem a difúzní sondou na stanovené získané difúzní parametry.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Barbora Tesařová
Student(ka)

Ing. Jiří Smilek
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na studium reaktivity chitosanu prostřednictvím jednoduchých difúzních technik v hydrogelových médiích na bázi agarózy. U připravených agarózových gelů s přídavkem chitosanu jsou zkoumány jejich mechanické vlastnosti pomocí oscilačních testů a také velikost pórů především s ohledem na difúzní parametry. Hlavním cílem této práce je prozkoumat reaktivitu chitosanu, agaróza zde slouží pouze jako podpůrná matice pro přípravu hydrogelu. Náplní řešeršní části práce je především studium reaktivity chitosanu na základě již publikovaných vědeckých článků.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on study of chitosan reactivity by simple diffusion processes realized in hydrogel media based on agarose. Mechanical properties studied by oscillatory measurements and the pore size were determined at agarose gels with the addition of chitosan as the main parameters influenced the transport properties. The main goal of this work is the investigation the reactivity of chitosan. Agarose is used only as a supporting matrix for the formation of a hydrogel. The state of the art is aimed primarily on the study of chitosan reactivity based on already published scientific papers.

KLÍČOVÁ SLOVA

chitosan, difúze, reaktivita, hydrogel, reologie

KEY WORDS

chitosan, diffusion, reactivity, hydrogel, rheology

TESAŘOVÁ, B. *Studium reaktivity kationaktivního biopolymeru pomocí jednoduchých difúzních technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 57 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jiří Smilek.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

Barbora Tesařová

*Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Smilkovi
za cenné rady a trpělivost.*

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	Chitosan.....	9
3.1.1	Struktura a vlastnosti chitosanu.....	9
3.1.2	Historie chitosanu a chitinu.....	10
3.1.3	Výskyt a výroba chitosanu	10
3.1.4	Využití chitosanu.....	11
3.2	Agaróza	13
3.3	Organická barviva	14
3.3.1	Coomassie Brilliant Blue	15
3.3.2	Methylenová modř	15
3.3.3	Saturnová modř	15
3.4	Gelové systémy	16
3.4.1	Vznik gelů	16
3.4.2	Vlastnosti gelů.....	17
3.5	Difúzní procesy	18
3.5.1	Difúze	18
3.5.2	Fickovy zákony	19
3.5.3	Řešení Fickových rovnic pro jednoduché případy difúze.....	20
3.5.4	Difúzní koeficient.....	20
3.6	Reologie.....	22
3.6.1	Reologie gelů.....	23
3.6.2	Viskoelastické testy.....	23
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	26
4.1	Chitosanové hydrogely.....	26
4.2	Difúze v difúzních celách.....	30
4.3	Stanovení velikosti pórů přítomných v hydrogelech.....	32
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
5.1	Použité chemikálie	34
5.2	Použité přístroje.....	34

5.3	Charakterizace materiálů	34
5.3.1	Studium viskoelastických vlastností hydrogelů	34
5.3.2	Stanovení velikosti pórů v hydrogelu.....	36
5.4	Příprava difúzních experimentů	36
5.4.1	Příprava difúzního experimentu za účelem výběru vhodného anionaktivního barviva	36
5.4.2	Příprava difúzního experimentu v diafragmové difúzní cele	37
5.4.3	Příprava difúzního experimentu za účelem neustálené difúze v kyvetách s použitím anionaktivního barviva	39
5.4.4	Příprava difúzního experimentu za účelem neustálené difúze v kyvetách s použitím kationaktivního barviva	40
6	DISKUZE A VÝSLEDKY	41
6.1	Charakterizace materiálů	41
6.1.1	Studium viskoelastických vlastností hydrogelů s obsahem chitosanu	41
6.1.2	Stanovení velikosti pórů v hydrogelu.....	44
6.2	Difúzní experimenty.....	44
6.2.1	Difúzní experiment za účelem výběru vhodného anionaktivního barviva.....	44
6.2.2	Stanovení difúzního koeficientu metodou difúzních cel.....	45
6.2.3	Stanovení difúzního koeficientu metodou neustálené difúze v kyvetách	46
7	ZÁVĚR	50
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	52
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	55
9.1	Použité zkratky	55
9.2	Použité symboly	56

1 ÚVOD

Chitosan je přírodní biopolymer, odvozený od chitinu, což je druhý nejrozšířenější polysacharid po celulóze. Chitosan je nejznámějším a nejdůležitějším derivátem chitinu, z něhož je získáván deacetylací [1]. Tento biopolymer patří mezi kationaktivní sloučeniny díky přítomnosti volné aminoskupiny, která je schopna se protonizovat v kyselém prostředí, což z chitosanu činí zajímavý materiál s ohledem na potenciální aplikační využití. V posledních letech se chitosan dostává do popředí mnohých vědeckých skupin, a to především díky jeho unikátním vlastnostem, mezi které patří biokompatibilita, biodegradabilita, jeho struktura a chování ve vodných roztocích.

V této práci byla pro studium reaktivity chitosanu využita hydrogelová forma na bázi lineárního polysacharidu - agaróza, která poskytuje celou řadu výhod, jelikož můžeme připravit vzorky s přesně definovanými vlastnostmi (tvar, velikost pórů apod.), což nám umožňuje difúzní procesy popsat správným matematickým modelem.

Teoretická část této bakalářské práce je zaměřena na popis použitých materiálů (chitosan, agaróza, Coomassie Brilliant Blue, methylenová modř, saturnová modř), studium difúzního procesu a metody stanovení difúzního koeficientu, prostřednictvím něhož charakterizujeme reaktivitu chitosanu. Závěrem teoretické části byla provedena rešerše současného stavu problematiky, která se zabývá především studiem chitosanových hydrogelů, studiem difúze v difúzních celách a stanovením velikosti pórů v hydrogelu.

Reaktivita chitosanu je v této práci zkoumána prostřednictvím těchto experimentálních metod: difúze v difúzních celách a nestacionární difúze v kyvetách, prověření mechanických vlastností na reometru je provedeno pomocí oscilačních testů a stanovení velikosti pórů pomocí UV-VIS spektrofotometru. V kapitole 6 jsou shrnuty naměřené výsledky a použitelnost metod.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem předložené závěrečné práce je stanovení difúzních charakteristik (difúzní koeficient, čas průchodu, koncentrace na rozhraní hydrogel-roztok) pro zvolený kationaktivní biopolymer na základě literární rešerše. Dále také charakterizace použitých hydrogelů pomocí UV-VIS spektrofotometrie a reologie.

Hlavní cíle této bakalářské práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Zpracování literární rešerše se zaměřením na metody experimentálního studia reaktivity biopolymerů.
- Výběr vhodné dvojice modelového biopolymeru a difúzního média (organické barvivo) na základě literární rešerše a její charakterizace standardními fyzikálně-chemickými metodami.
- Stanovení zvolené difúzní charakteristiky (difúzní koeficienty, čas průchodu) pro zvolené kombinace biopolymer/difúzní sonda.
- Diskuze vlivu interakce mezi biopolymerem a difúzní sondou na stanovené získané transportní parametry.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Chitosan

3.1.1 Struktura a vlastnosti chitosanu

Chitosan se řadí mezi přírodní biopolymery. Vzniká deacetylací chitinu, jehož je neznámějším derivátem. Obecně je známo, že chitosan patří mezi kationaktivní polysacharidy s předpokladem interagovat s negativně nabitými suspendovanými částicemi, které jsou přítomny například v přírodních zakalených vodách. Reference [2] odkazuje na použití chitosanu coby koagulačního činidla. Struktura chitinu je tvořena z N-acetylglukosaminů (2-acetylamino-2-deoxy-Dglukopyranosa, GlcNAc), které jsou vzájemně propojené β (1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou, zatímco chitosan je v podstatě deacetylovaný chitin (2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosa, GlcN), jehož strukturní vzorec je uveden na obrázku 1. Chitin stejně jako chitosan nepatří mezi homopolymery, jelikož oba obsahují proměnlivý počet jednotek GlcN (glukosaminové jednotky) a GlcNAc (N-acetylglukosaminové jednotky). Podíl glukosaminových jednotek k celkovému počtu glukosaminových a N-acetylglukosaminových skupin udává hodnota F_A nazývaná jako stupeň acetylce (DA), případně stupeň deacetylce (DD). Čistý, 100 % acetylovaný chitin stejně tak jako 100 % deacetylovaný chitosan se v přírodě nevyskytují. Běžné zastoupení N-acetylglukosaminových jednotek v přírodě je 70 – 90 %, z čehož vyplývá, že v přírodě převládá chitin [3]. Další možností odlišení těchto biopolymerů je jejich rozpustnost ve vodných roztocích minerálních kyselin (citronové, mravenčí či octové). Chitin, obsahující cca >40 % GlcNAc jednotek, není rozpustný, kdežto chitosan ano. Chitosan je tedy rozpustný ve zředěných kyselinách (mravenčí, octová, minerální kyseliny). Ve většině organických rozpouštědel je, stejně jako ve vodě, nerozpustný, výjimku tvoří směs dimethylformamidu/ N_2O_4 . Chitin je stejně jako chitosan nerozpustný ve vodě a ve většině organických rozpouštědel, ale na rozdíl od chitosanu je nerozpustný ve zředěných kyselinách [3].



Obrázek 1: Struktura chitosanu [4]

Chitosan má na rozdíl od chitinu mnohem větší chemickou a biochemickou aktivitu, což je zapříčiněno přítomností volné aminoskupiny. Díky přítomnosti této aminoskupiny je chitosan schopen tvořit komplexy s ionty kovů a způsobuje, že se chitosan chová ve vodných roztocích jako polykationt. Tímto chováním v roztocích se chitosan řadí mezi unikátní polysacharidy.

Díky těmto vlastnostem je schopen interakce s mnoha záporně nabitými sloučeninami, této vlastnosti se využívá například v biomedicině. Na reaktivitě chitosanu se podílí mimo primární aminoskupiny také primární a sekundární hydroxyskupina. Struktura chitosanu a jeho chování ve vodných roztocích patří mezi hlavní důvody narůstajícího zájmu vědeckých a výzkumných institucí. Reference [5] poskytuje ucelený souhrn pokroků, ke kterým došlo při výzkumu chitosanu. Zmiňuje se například o výzkumu autorů H. a J. Peniche, kteří se zabývají přípravou nanočástic z chitosanu a jejich aplikací při transportu léčiv či genové terapii [6]. Dále odkazuje na výzkum zabývající se přípravou kompozitních materiálů vyrobených z oxidu vápenatého a chitosanu, které by měly sloužit jako účinné katalyzátory pro výrobu bionafty transesterifikací sójového oleje s metanolem [7]. Výzkumem chitináz se zabývá reference [8], výzkum se zaměřuje především na jejich struktury, mechanismy reakcí a funkce této skupiny. Výzkum se také zaměřuje na jejich možné využití při depolymerizaci chitinu či obranných mechanismech rostlin.

3.1.2 Historie chitosanu a chitinu

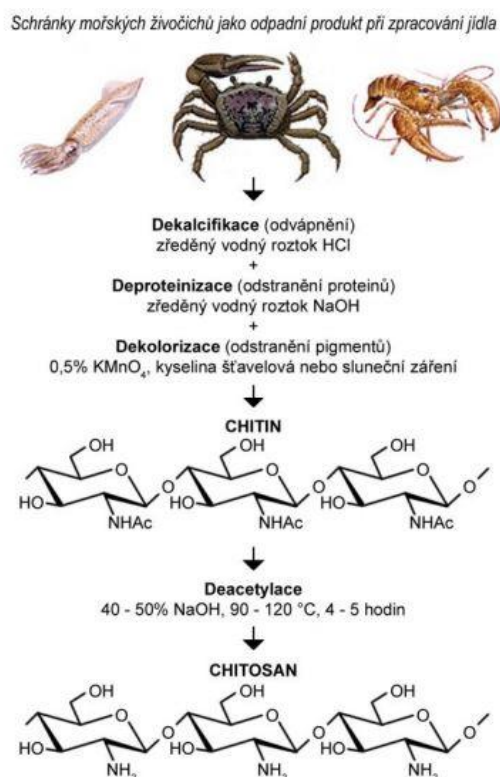
Chitin byl poprvé izolován z hub v roce 1811, roku 1832 byl izolován z kutikul hmyzu a pojmenován. Chitosan byl poprvé popsán roku 1859 C. Rougetem. V roce 1894 byl pojmenován Hoppe-Seylerem a byl v něm potvrzen obsah glukosaminu. V 50. letech 20. století byla rozeznána struktura chitinu i chitosanu pomocí rentgenové difrakce, infračervené spektroskopie (IČ) a enzymatické analýzy. Od 60. let 20. století roste množství vědeckých článků a publikací zabývajících se chitinem a chitosanem a je započato studium komplexů chitinu s proteiny [3]. V současné době nachází chitosan uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích.

3.1.3 Výskyt a výroba chitosanu

Chitin, jakožto základní komponenta pro výrobu chitosanu, se vyskytuje ve třech modifikacích α -, β - a γ -, které se vzájemně liší orientací mikrovláken. α -chitin se nachází především v tělesných schránkách korýšů (krabů, garnátů, atd.), v buněčných stěnách hub a kvasinek a ve skořápkách a kostrách měkkýšů. α -chitin je v přírodě nejvíce rozšířen na rozdíl od β -chitinu, který je v přírodě vzácný. β -chitin se vyznačuje snadným bobtnáním a větší rozpustností ve srovnání s α -chitinem. γ -chitin je směsí předchozích dvou. Chitosan se v přírodě vyskytuje pouze v malém množství u několika rodů hub *Aspergillus* a *Mucor* [3].

Jedním ze zdrojů chitinu jsou rozemleté tělesné schránky živočichů. Schránky tvoří proteiny (30-40 %), minerální soli (30-50 %), chitin (13-42 %), malé množství lipidů, pigmentu. Po jejich rozemletí dochází k odvápnění rozemletého prášku (dekalcifikaci) pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové. K odstranění proteinů (deproteinizaci) dochází vlivem zředěného roztoku hydroxidu sodného. Následná ztráta pigmentů (bělení) je zajištěna buď chemickou oxidací anebo vlivem slunečního světla. Takto izolovaný chitin prochází několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným nebo se na něj působí enzymaticky prostřednictvím N-deacetylasy. Výsledkem deacetylase je vznik heteropolymeru složeného z glukosaminových a acetylglukosaminových jednotek. Celý proces výroby je znázorněn na obrázku 2. V dnešní době je hlavním zdrojem chitinu, respektive chitosanu, odpad

z potravinářského průmyslu především v těchto zemích: USA, Japonsko, Polsko, Norsko, Austrálie, Čína [3,4].



Obrázek 2: Výroba chitinu a chitosanu [4]

Dalším zdrojem chitinu a chitosanu jsou mikrobiální zásobárny, které představují obrovský potenciál do budoucna. Jedná se především o buněčné stěny mikrobiálních hub obsahující chitin, chitosan a řadu dalších polysacharidů. Mezi hlavní výhody izolace zmíněných polysacharidů patří vyšší efektivita (snadná dostupnost chitinu) a nízká cena [3].

3.1.4 Využití chitosanu

Chitosan díky svým vlastnostem nachází široké uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích, mezi které patří například textilní, papírenský nebo potravinářský průmysl. Uplatňuje se rovněž v medicíně, biotechnologiích a zemědělství. Nejčastější způsoby využití chitosanu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Využití chitosanu v praxi [9]

Oblasti využití	Způsob využití
Úprava a čištění vody	Adsorpce kovových iontů a barvy, flokulace proteinů.
Biotechnologie	Imobilizace enzymů, čištění proteinů.
Medicína	Snížování tuků v krvi, léčba revmatických nemocí.
Farmacie	Postupné uvolňování léčiv
Zemědělství	Regulátor růstu rostlin, hnojivo.
Potravinářství	Čištění nápojů, obalový materiál, potravinové doplňky

Chitosan také nachází své uplatnění v ochraně životního prostředí, konkrétně při úpravě vody, kde se využívá jeho sorpčních vlastností a vysoké afinity k těžkým kovům [9]. Díky svému kladnému náboji se chitosan využívá k zastavení krvácení, tedy jako antikoagulant, jelikož přitahuje záporně nabitě červené krvinky (erytrocyty). Nadneseně řečeno, dochází tak k tvorbě zátky z červených krvinek. Pro tento účel se používá speciálně upravená forma chitosanu, konkrétně karboxymethylovaný chitosan [10]. Navíc je chitosan schopen pevně přilnout k ráně, a tak kontrolovat krvácení. Chitosan aplikovaný lokálně podporuje hojení kůže, a to buď stimulací tvorby granulační tkáně nebo reepitelizací (opětovnou tvorbou epitelové tkáně). Bylo zjištěno, že chitosan inhibuje tvorbu fibroblastů, které se podílejí na tvorbě jizevnaté tkáně, a tím umožňuje normální regeneraci tkání. Proto je také chitosan hojně využíván při léčbě popálenin. Používá se tedy k tvorbě obvazů a chirurgických nití. Nízkomolekulární chitosan se také hojně používá k přípravě kontaktních čoček, a to především díky jeho biokompatibilitě, optické transparentnosti, mechanické stabilitě, propustnosti pro plyny, smáčivosti a snadnému přijetí lidským tělem. Kompozitní materiály (kompozity chitosanu a hydroxyapatitu) nacházejí svoje uplatnění při tvorbě tzv. *scaffoldů* [11]. *Scaffoldy* slouží v tkáňovém inženýrství jako matrice pro růst nových buněk, tkání či dokonce orgánů. Při této formě aplikace se využívá porézních chitosanových forem připravených lyofilizací chitosanových gelů. Mezi další biomedicínské aplikace chitosanu patří jeho uplatnění jako nosiče léčiv. Chitosan se jako nosič léčiv může vyskytovat ve třech formách: hydrogely, tablety nebo mikrokapsule. U hydrogelů se využívá jejich závislosti nabobtnání na pH, což je vhodné pro cílený transport. Mikrokapsule jsou duté kulaté částice o velikosti 50 nm až 2 mm [10].

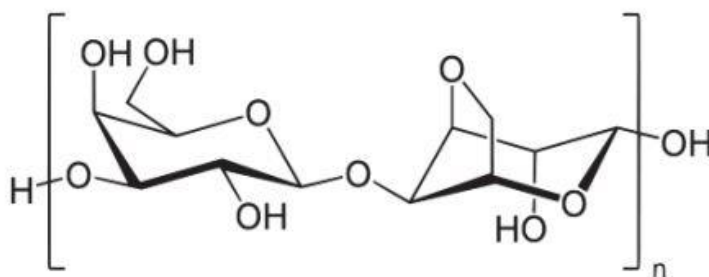
Chitosan nabízí rozmanité využití v potravinových doplncích, které jsou určeny k redukci tělesné hmotnosti. Díky přijímání chitosanu s potravou dochází ke sníženému vstřebávání tuků, protože chitosan váže až několiknásobně více tuků než je jeho hmotnost [12]. Pozitivní vliv na hmotnost a krevní tuky by mohl vysvětlovat i mírné snížení zvýšeného krevního tlaku, které bylo zjištěno po podávání chitosanu. Při klinických studiích účinku chitosanu

podávaného jako součást diety bylo zjištěno, že zvyšuje účinnost léků podávaných při léčbě hypertenze (vysokého krevního tlaku).

Chitosan nachází své uplatnění také v kosmetice, a to především ve vlasové kosmetice (ochrana vlasů, antielektrostatický efekt), pleťových krémech (zvlhčující efekt, zlepšení penetrace lipofilních látek kůži) a zubních pastách (antibakteriální a fungicidní efekt) [9]. V zemědělství se využívají chitosanové přípravky zvyšující odolnost rostlin proti houbové, mikrobiální a virové infekci [9].

3.2 Agaróza

Agaróza je díky svým výjimečným vlastnostem, především schopnosti gelace, známá a využívaná již celá staletí. Strukturně se jedná o lineární polysacharid složený z jednotek agarobiózy, který je tvořen navzájem opakujícími se podjednotkami galaktózy a 3,6-anhydrogalaktózy. Struktura je znázorněna na obrázku 3. Její hlavní výhoda spočívá v tom, že se jedná o prakticky zcela nenabitý polysacharid, který ovšem může obsahovat příměsi nabitých sulfátových a pyruvátových skupin. Mezi její další výhody patří dobrá optická průhlednost a termoreverzibilita. Z tohoto důvodu lze připravit gely vhodné pro studium reaktivity biopolymerních látek.



Obrázek 3: Strukturní vzorec agarózy [13]

V přírodě se agaróza vyskytuje u mořských řas typu *Agarophytea* to ve formě agaru obsaženého v buněčné stěně [14].

Hlavní výhodou agarózy je její termoreverzibilita, která se projevuje hysterezí při změně teploty v určitém rozsahu. *Teplota tuhnutí (bod gelace)* je nižší než *teplota ztekucení*, obě hodnoty však závisejí na rychlosti ohřívání či chlazení a koncentraci systému a také na molekulové hmotnosti. Rozdíly v bodech gelace lze vysvětlit tím, že při ochlazování solu vznikají nejprve málo pevné vazby, které se postupně upevňují, aby tyto pevnější vazby byly při převedení gelu zpět na sol zrušeny, je zapotřebí zahřátí na vyšší teplotu [15]. Je známo několik komerčně dostupných druhů agarózy lišících se bodem gelace. Agaróza s vysokým bodem gelace je rozpustná při teplotě 95 °C, naopak agaróza s nízkým bodem gelace je v roztocích rozpustná již při teplotě nižší než 65 °C. Běžné druhy agarózy jsou rozpustné při 85 °C.

Při chladnutí zahřátého roztoku dojde k vytvoření polotuhé gelové hmoty při teplotě nižší než 40 °C, která vzniká proplétáním řetězců a následnou stabilizací pomocí vodíkových

můstků. V pevném stavu zaujímá agaróza jednoduchou nebo dvojitou helikální konformaci. Proces gelace souvisí se změnou chemické struktury, přičemž dochází k nárůstu dvojitých helikálních struktur a následnému vzniku třidimenzionálních sítí. Jako většina gelů vykazuje i agaróza jev zvaný *synereze*, jedná se snižování objemu gelu v důsledku jeho stárnutí, jev je doprovázený samovolným vytlačováním disperzního prostředí na povrch gelu. *Synereze* se projevuje především u nově vytvořených systémů, které ještě nedosáhly termodynamické rovnováhy. Během tohoto procesu je formována finální struktura hydrogelu a vytváří se styčné body (uzly).

Agaróza našla řadu praktických uplatnění v laboratorní praxi, vytváří síťovitý materiál, v němž může být v přítomnosti vhodných pufrů realizována elektroforéza. Elektroforéza na agarózovém gelu je běžně využívána v klinické praxi pro identifikaci enzymů v krevním séru a plazmě [14].

Svoje uplatnění našla agaróza i v imunologii jako prostředek pro detekci a studium antigenních materiálů. Díky velikosti pórů agarózového gelu, jeho relativní chemické neutralitě a vysoké čistotě je ideálním médiem pro imunologické reakce. Mnoho komplexů antigen – protilátka je v ní nerozpustných a dochází k jejich oddělené difúzi skrz agarózový hydrogel. V místě setkání těchto látek se vytváří zákal. Mnoho imunologických metod je založeno právě na vizualizaci této interakce [14].

V chromatografii se agarózy využívá především jako náplně kolon, kde slouží jako separační médium k separaci na molekulární úrovni. Zde se opět využívá jednotné velikosti pórů, která se dá ovlivnit koncentrací agarózy. Je používána pro separaci molekul větších než 250 000 Da [14].

Agaróza se v potravinářském průmyslu nejčastěji uplatňuje jako želírovací a zahušťovací prostředek do cukrovinek, mléčných a mastných výrobků, náplní pečiva, pomazánek, nápojů, atd. Zde se využívá spíše méně koncentrovaných gelů [16].

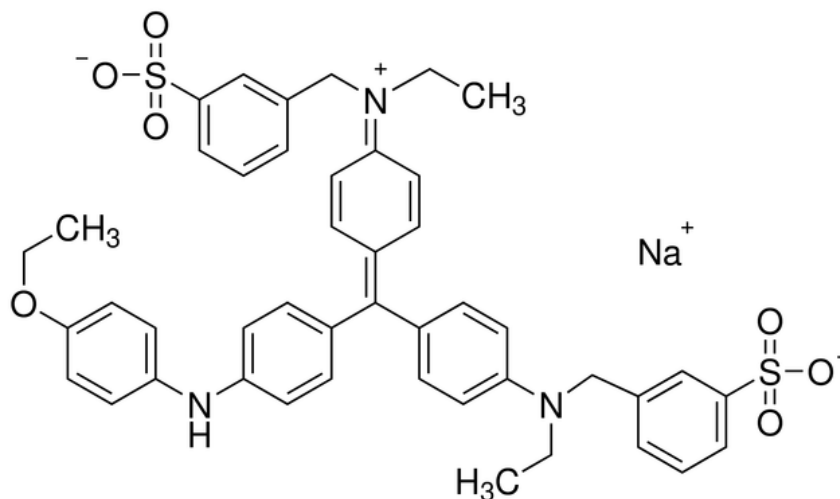
Agaróza nachází své uplatnění také v biomedicínských aplikacích nebo tkáňovém inženýrství. O tomto využití pojednává reference [17]. Autoři zde zkoumali využití agarózy jako *scaffoldu* v tkáňovém inženýrství. Reference shrnuje nový postup výroby agarózových *scaffoldů* s přesnými rozměry jednoosých kanálků a fyzikální strukturou podobnou lidské míše. Hlavní výhodou agarózy je přítomnost vody v gelu, která vyživuje a podporuje růst buněk či tkání.

3.3 Organická barviva

Následující kapitola se věnuje barvivům použitým v experimentální části. Barviva při studiu difúzních jevů sloužila jako difúzní sondy. Mezi hlavní výhody použití barviv jakožto difúzních sond patří především jejich známá molekulová hmotnost, struktura a možnost přípravy barviva o zvolené koncentraci a objemu. Výběru barviv se věnuje kapitola 5.4.1.

3.3.1 Coomassie Brilliant Blue

Coomassie známé také pod názvy Brilliant Blue, Brilliant Blue G, Acid Blue 90, C.I. 42655, Brilliant Blue G 250 nebo Brilliant blue R 250 patří mezi anionaktivní barviva. Vyskytuje se ve dvou formách a to R 250 a G 250. Forma R 250, která byla použita v této práci, postrádá, oproti formě G 250, dvě methylové skupiny. Struktura tohoto barviva je znázorněna na obrázku 4.

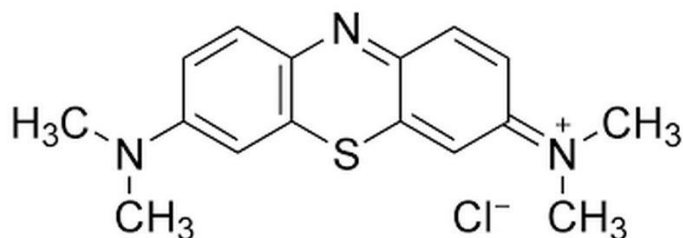


Obrázek 4: Struktura barviva Coomassie Brilliant Blue [18]

Toto barvivo se v minulosti používalo k barvení vlny, nyní se běžně používá při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného a je základní složkou při přípravě Bradfordova činidla. Vazby mezi proteiny způsobují, že barvivo může měnit barvu od červeno-hnědé po jasně modrou. Absorpční maximum se nachází při vlnové délce 595 nm.

3.3.2 Methylenová modř

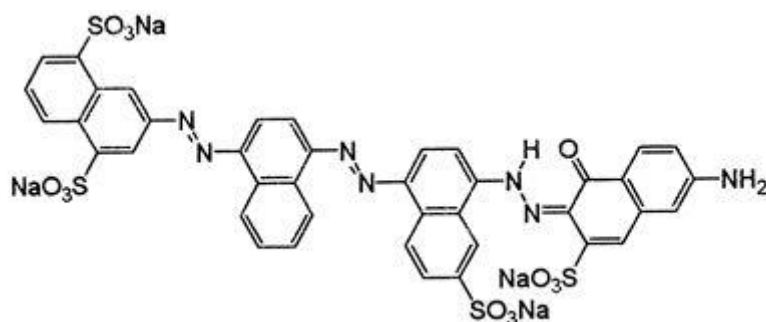
Methylenová modř se řadí mezi kationaktivní barviva, strukturně se jedná o 3,7-bis(dimethylamino)-fenothiazin-5-ium-chlorid, C.I. 52015. Nachází uplatnění především v akvaristice a rybníkářství. Struktura je znázorněna na obrázku 5.



Obrázek 5: Struktura barviva Methylenová modř [18]

3.3.3 Saturnová modř

Saturnová modř neboli též LBRR či Direct blue, C.I. 34140 se řadí mezi anionaktivní azobarviva. Nachází uplatnění jako textilní barvivo pro koberce či bavlnu. Je rozpustná ve vodě a etanolu, nerozpustná v ostatních organických rozpouštědlech.



Obrázek 6: Struktura barviva Saturnová modř [19]

3.4 Gelové systémy

Gelové systémy se řadí mezi disperzní soustavy, jedná se o soustavu obsahující alespoň dva druhy hmoty (složky nebo fáze), přičemž jeden je rozptýlen ve druhém ve formě více či méně jemných částic. Rozptýlené částice se nazývají *disperzní podíl* a spojitý druh je *disperzní prostředí*. Gely jsou disperze tuhých látek v kapalinách. Dispergované látky jsou v tomto případě tuhé látky, jejichž spojováním ve většině případů vzniká síťovaná struktura obvykle koloidní velikosti. Disperzní soustavy dělíme na:

- Analyticky disperzní: rozptýlené částice jsou menší než 1 nm,
- Koloidně disperzní: dispergovanou fází tvoří částice velikosti 1 až 1000 nm,
- Hrubě disperzní: částice jsou větší než 1000 nm.

Gel definujeme jako třídídimenzionální síť tvořený systém, přičemž zpravidla jeden z rozměrů spadá do koloidní oblasti. Tato síť vytváří souvislou strukturu, která prostupuje celým disperzním prostředím. V takto vzniklé síťové struktuře nejsou disperzní částice schopny nezávislého pohybu, jelikož jsou poutány *adhezními silami*. Disperzní částice vykonávají pouze vibrační pohyb. *Lyogel* je nejčastější typ gelu, ve kterém je disperzní prostředí kapalné. V případě hydrogelů je disperzním prostředím voda. Pokud je naopak disperzní prostředí odstraněno vysušením, vzniká *xerogel*. *Izogel* je zvláštní typ makromolekulárního gelu, ve kterém je disperzní prostředí monomerním disperzním podílem např. styren v polystyrenu.

Hydrogelové systémy nacházejí uplatnění v řadě průmyslových a environmentálních aplikací, a to především v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Přehled o aplikacích hydrogelů poskytuje reference [20]. Reference [21] popisuje jednu z možných environmentálních aplikací huminového hydrogelu, která spočívá ve snížení kontaminace půd rtuť pomocí huminových kyselin.

3.4.1 Vznik gelů

Proces tvorby gelů se nazývá *gelace*. Při *gelaci* dochází ke spojování koloidních částic disperzního podílu v souvislou strukturu, která se postupně zpevňuje a tím vzniká gel. Gely rozlišujeme dle způsobu vzniku na fyzikální a chemické. Chemické gely jsou gely vzniklé chemickou reakcí, patří sem například gely vzniklé fotochemickým vytvrzováním. Fyzikální

gely vznikají změnou fyzikálního stavu roztoku, což může být například změna teploty či změna rozpouštědla [22].

Gelace je dle reference [23] ovlivňována:

- *Teplotou*: zvýšení teploty zpravidla brání vzniku gelu, jelikož vzrůstá intenzita tepelného pohybu jednotlivých segmentů. Gely, které lze zahříváním převést na roztok a ochlazením zpět na gel se nazývají *termoreverzibilní*,
- *Koncentrací*: zvýšení koncentrace napomáhá gelaci roztoků vysokomolekulárních látek. Zvýšením koncentrace roste četnost srážek makromolekul, tím dochází ke zvětšování počtu vazeb v jednotce objemu gelu,
- *pH*: pH má na gelaci velký vliv hlavně u roztoků amfoterních vysokomolekulárních elektrolytů. Gelace nejlépe probíhá při pH odpovídající izoelektrickému bodu.

Gely nejčastěji klasifikujeme podle jejich chování ve vysušeném stavu. Gely, které při vysoušení zmenšují svůj objem, nazýváme *reverzibilní*. Jsou schopny vrátit se do původního stavu procesem zvaným *bobtnání*, který nastává po přidavku disperzního prostředí. Mezi reverzibilní gely se řadí například gely makromolekulárních látek. Druhým typem jsou gely, které si při vysoušení zachovávají konstantní objem, jedná se o gely *ireverzibilní*. Jejich charakteristickým znakem je vznik porézního xerogelu. Vysoušení ireverzibilního gelu za vzniku xerogelu je nevratný proces, což znamená, že se tento gel při kontaktu s disperzním prostředím nevrací do původního stavu, ale pouze omezeně bobtná.

3.4.2 Vlastnosti gelů

Typické vlastnosti gelů jsou následující: mechanické vlastnosti, elektrická vodivost a difuzivita, anizotropie gelů, optické vlastnosti vysokomolekulárních lyogelů a stárnutí gelů.

- *Mechanické vlastnosti*: Gely se chovají jako elastické tuhé látky do určité hodnoty kritického (tečného) napětí. Pokud tuto hodnotu nepřekročíme, jedná se o elastickou (vratnou) deformaci. Hodnota kritického napětí závisí na koncentraci uzlů, na jejich pevnosti a na druhu spoje. Fyzikální spoje mají menší pevnost než spoje chemické. Prudkým protřepáním lze gely převést na sol, jelikož se zruší slabé vazby mezi částicemi. Jestliže necháme tekutý sol v klidu, vazby se obnoví a dochází ke vzniku nového gelu. V tomto případě se gel vyznačuje *tixotropními vlastnostmi*. Opakem *tixotropie* je jev nazývaný *reopexie*, který způsoben tím, že při pohybu soustavy nastávají příznivější podmínky pro tvorbu nových spojů. Mechanické namáhání tedy v tomto případě způsobuje zvyšování viskozity.
- *Elektrická vodivost a difuzivita*: Elektrická vodivost gelu zůstává téměř stejně vysoká jako u původního solu, ze kterého gel vznikl. Významnou výhodou je fakt, že difuzivita nízkomolekulárních látek je o něco menší než v solu, i když při gelaci vzrostla viskozita systému. Difuzivita nízkomolekulárních iontů v gelech není ovlivněna tepelnými konvekcemi ani prouděním díky síťovité struktuře gelu.

- *Anizotropie gelů:* Anizotropií gelů rozumíme změnu lineárních rozměrů vzorku gelu při bobtnání gelu, lomu a pohlcování světla i změnu mechanických vlastností. Je způsobena především nerovnoměrnou objemovou kontrakcí při vysoušení nebo deformací při tvorbě gelu. Anizotropii vykazují většina gelů vyskytujících se v rostlinách nebo v živočišném těle.
- *Stárnutí gelů:* Procesem stárnutí roste počet styčných bodů gelu a smršťuje se jeho síťovitá struktura. Část přítomné kapaliny je vytlačována na povrch gelu. Tento jev nazýváme *synereze* a můžeme ho podpořit zvýšením teploty či přidáním elektrolytu.

3.5 Difúzní procesy

3.5.1 Difúze

Pod pojmem difúze rozumíme přestup hmoty, který probíhá v navenek nehybné fázi. Přestup hmoty se uskutečňuje jako relativní mikroskopický transport částic jedním směrem a probíhá na základě *Brownova pohybu*. Přestože se tento pohyb v mikroskopickém měřítku jeví jako nahodilý, v makroskopickém měřítku probíhá vždy z míst o vyšší koncentraci do míst o nižší koncentraci [24]. Přírozenou vlastností látek schopných pohybu je rozptýlení do celého prostoru a postupné vyrovnávání koncentrace v prostoru.

Hnací silou přestupu hmoty je koncentrační gradient přítomný mezi dvěma místy, mezi kterými se difúze uskutečňuje. Spojením prvního a druhého termodynamického zákona za podmínek konstantního tlaku a teploty pro maximální práci dw (nikoliv objemovou), kterou může vykonat 1 mol látky o chemickém potenciálu μ při transportu do místa s chemickým potenciálem $\mu + d\mu$, platí, že je rovna Gibbsově energii. V případě, že je chemický potenciál funkcí prostorové souřadnice x , platí vztah:

$$dw = \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} dx. \quad (1)$$

Porovnáním rovnice (1) s teoretickým předpokladem vyjádření práce dostáváme:

$$dw = -Fdx, \quad (2)$$

kde F představuje sílu působící v opačném směru. Síla, která působí na 1 mol částic, může být vyjádřena prostřednictvím směrnice poklesu potenciálu podél prostorové souřadnice:

$$F = - \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T}, \quad (3)$$

síla F charakterizuje tendenci částic k rozptýlení.

O *binární difúzi* hovoříme v případě, že proces difúze není pouze jednostranný, ale jedná se o vzájemnou difúzi [25]. Pojmem *samodifúze* charakterizujeme pohyb molekuly v prostředí o nulovém koncentračním gradientu. Tento jev využíváme často v experimentech spojených se studiem transportních jevů.

Rychlost *samodifúze* je ovlivňována především teplotou, tlakem, velikostí pohybující se molekuly a viskozitou prostředí. V nerovnovážných systémech je naopak rychlost difúze dána především koncentračním gradientem. V roztocích polymerů se rychlost difúze pohybuje mezi rychlostí difúze v kapalinách (přibližně 0,05 cm / min) a rychlostí difúze v pevných látkách (přibližně 10^{-5} cm / min) [25].

3.5.2 Fickovy zákony

Fickovy zákony byly pojmenovány dle německého fyzika Adolfa Eugena Ficka, který jako první matematicky popsal difúzní procesy přepisem Fourieriho zákona pro vedení tepla a Ohmova zákona pro vedení elektřiny.

$$J_1 = Aj_1 = AD \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (4)$$

kde J_1 představuje celkový difúzní tok, A je velikost plochy, přes kterou látka difunduje, j_1 je tok přes jednotkovou plochu, c_1 je koncentrace a x je vzdálenost. *Difúzní koeficient* neboli *difuzivita* je označena symbolem D a představuje míru mobility molekul v dané látce. Udává se v jednotkách m^2/s . Prostřednictvím tohoto parametru můžeme jednotlivé difúzní procesy srovnávat.

Přestože schopnost difúze mají v systému všechny látky, které se mohou pohybovat, jsou následující rovnice uvedeny pouze pro difúzi jedné určité látky. V systému tvořeném n látkami získáváme n rovnic, z nichž každá popisuje pouze jednu látku. Jelikož jsou difúzní toky vzájemně sprzęžené, není toto vyjádření explicitně nutné.

První Fickův zákon popisuje difúzní tok jako vektorovou veličinu, které odpovídá množství difundované látky přes jednotkovou plochu za jednotkový čas.

$$J_1 = -D \cdot \text{grad } c_1. \quad (5)$$

Znaménko minus na pravé straně rovnice je uvedeno z důvodu průběhu difúze proti směru koncentračního gradientu. Difúzní tok se udává v jednotkách $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Rovnici (5) lze zjednodušit v případě, že difúze probíhá ve směru jedné osy na tento tvar:

$$J_1 = -D_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (6)$$

v případě rovnice (6) je hnací silou koncentrační gradient pouze ve směru osy x .

Druhý Fickův zákon vyjadřuje časovou změnu koncentrace difundující látky při nestacionární difúzi:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \text{div}(D \cdot \text{grad } c_1) = D \cdot \text{div grad } c_1. \quad (7)$$

Rovnice (7) platí pouze v případě nezávislosti difúzního koeficientu na koncentraci a je nezávislá na volbě souřadnicového systému. Vztah můžeme opět zjednodušit volbou jednorozměrné nestacionární difúze ve směru souřadnice x :

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}. \quad (8)$$

3.5.3 Řešení Fickových rovnic pro jednoduché případy difúze

Za účelem řešení Fickových rovnic pro jednotlivé druhy difúze vznikla databáze difúzních modelů řešících tuto problematiku. Crank publikoval v referenci [26] řešení difúzních rovnic pro celou řadu modelů a okrajových podmínek. *Difúze skrz tenký film a volná difúze* patří bezesporu k nejjednodušším difúzním modelům.

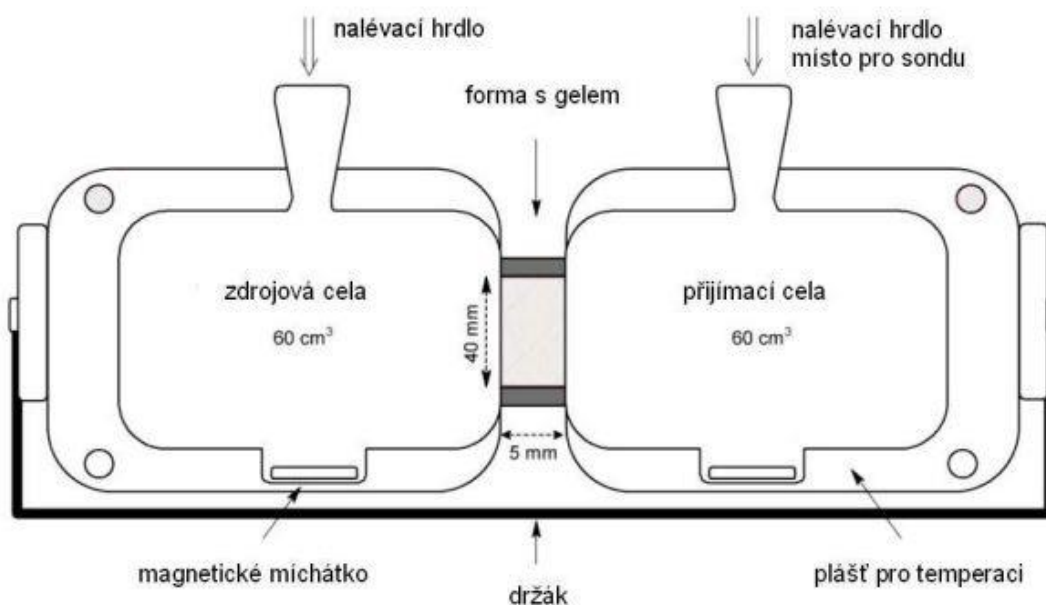
3.5.4 Difúzní koeficient

V roztocích polymerů se difúzní koeficient pohybuje okolo $10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, kvůli těmto nízkým hodnotám je jeho stanovení poměrně náročné, i přesto umožňují vybrané metody stanovit difúzní koeficient s odchylkou pouze 5 až 10 % od skutečné hodnoty. Metody uvedené v této kapitole se vyznačují svou přesností, snadnou proveditelností či jinou specifickou výhodou.

Ke stanovení koncentrace látky a s ní související rychlosti difúze se ve většině případů vychází z běžně používané analytické metody pro stanovení dané látky. Mezi nejrozšířenější metody patří metody spektroskopické, které byly použity i v této práci. Často používanými metodami jsou také metody optické či potenciometrické. Využívají se i sofistikované metody založené na ozáření vzorku iontovým paprskem nebo laserem, po kterém následuje měření složitými nukleárními technikami (Nukleární magnetická rezonance a další). Reference [27, 28] nabízejí souhrn použitelných metod.

Metoda Stokesovy Diafragmové cely

Hlavními výhodami této metody je vysoká přesnost (v určitých případech s odchylkou až 0,2 %) a nízká cena, proto je tato metoda často volena jako startovací metoda. Potřeba velkých objemů studovaných látek naopak patří mezi hlavní nevýhody.



Obrázek 7: Schéma horizontální difúzní cely

Difúzní cela, jejíž schéma je uvedeno na obrázku 7, primárně slouží ke studiu penetrace aktivní látky skrz lidskou kůži [29]. Při našem měření byla zvolena difúze skrz hydrogelovou přepážku o přesně definované tloušťce a tvaru. Diafragmová difúzní cela se skládá ze dvou oddělitelných komor, mezi něž se vkládá porézní přepážka, která má podobu membrány nebo tuhé či polotuhé látky. Obě komory jsou naplněny roztoky o různé koncentraci, pro zajištění co nejvyššího koncentračního gradientu se přijímací cela ve většině případů plní destilovanou vodou a zdrojová cela koncentrovaným roztokem. V našem případě představovalo koncentrovaný roztok organické barvivo. Změna koncentrace se měří určenou analytickou metodou v přijímací cele, difúzní koeficient se pak vypočte ze vztahu:

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left[\frac{(c_{1,dolní} - c_{1,horní})_0}{(c_{1,dolní} - c_{1,horní})_t} \right], \quad (5)$$

kde β představuje konstanty aparatury, udává se v cm^{-2} a stanovíme jej pomocí následující rovnice:

$$\beta = \frac{A \cdot \varepsilon}{l} \ln \left(\frac{1}{V_{horní}} + \frac{1}{V_{dolní}} \right), \quad (6)$$

kde A značí velikost plochy, přes kterou látka difunduje, veličina ε představuje rozdělovací koeficient na rozhraní a V reprezentuje celkový objem cely. Konstanta aparatury β je velice výrazně ovlivňována vlastnostmi membrány a musí být proto stanovena experimentálně. Mezi vlastnosti membrány ovlivňující konstantu aparatury patří především velikost pórů, při měření je vhodné minimalizovat velikost pórů, čímž se zabrání konvekčnímu míchání, avšak prodlužuje se tím doba trvání experimentu.

Metoda konstantního zdroje

Tato metoda je velmi rozšířená v praktických technických úlohách, jako například rozpouštění pevné látky ve viskózní kapalině při korozi žáruvzdorného materiálu. Hlavním předpokladem této metody je dostatečně velké difúzní médium, které je v kontaktu se zdrojem difundující látky o neměnné koncentraci c_0 . Okrajové podmínky této metody jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Okrajové podmínky metody konstantního zdroje

Čas	Vzdálenost od rozhraní	Koncentrace difundující látky
$t = 0$	$x > 0$	$c_1 = 0$
	$x = 0$	$c_1 = c_{10}$
$t > 0$	$x = 0$	$c_1 = c_{10}$

Druhý Fickův zákon získává tvar:

$$\frac{c_1}{c_{10}} = \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4Dt}} = 1 - \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4Dt}} \quad (11)$$

a celkové množství látky, prošlé rozhraním o jednotkové ploše za čas t , určíme pomocí:

$$n_1 = 2c_{10}\sqrt{\frac{Dt}{\pi}}. \quad (12)$$

Pokud má koncentrace látky nenulovou hodnotu, dostáváme tento tvar:

$$\frac{c_1 - c_{11}}{c_{10} - c_{11}} = \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4Dt}}, \quad (13)$$

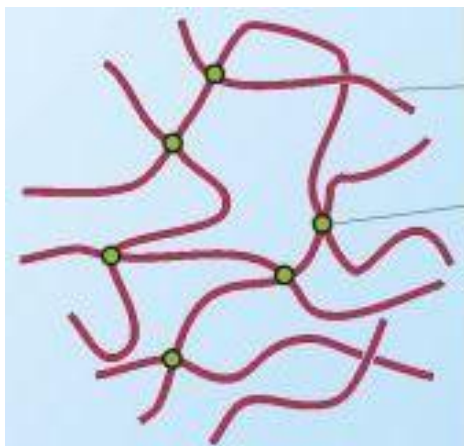
kde c_{11} je původní (nenulová) koncentrace látky v médiu.

3.6 Reologie

Reologie popisuje deformace pevných látek, kapalin nebo plynů vlivem vnějších sil. Tyto deformace mohou být *elastické* nebo *neelastické*. Působíme-li na těleso silou menší než je hodnota kritického (tečného) napětí, po ukončení působení této síly, se těleso vrací do původního stavu. Jedná se o elastickou deformaci, které jsou vykazovány především tuhými látkami. Pokud ovšem působíme na těleso silou větší než je hodnota kritického (tečného) napětí, po ukončení působení této síly se těleso nevrací do původního stavu, ztrácí svou elasticitu a teče. V užším pojetí je tedy reologie nauka o toku látek. Mezi těmito dvěma extrémy se nacházejí látky, jejichž odezva na působící deformační sílu záleží na době působení této síly, nazýváme je *viskoelastické*.

3.6.1 Reologie gelů

Gely jsou disperze tuhých látek v kapalinách a svým chováním se řadí mezi viskoelastické materiály. Gely vykazují vlastnosti tuhých látek až do určité hodnoty kritického napětí, po překročení tohoto napětí gel přestává aplikovanému napětí odolávat. Hodnota tečného napětí je především ovlivňována koncentrací a pevností uzlů ve struktuře gelu. Struktura gelu je znázorněna na obrázku 8.



Obrázek 8: Struktura gelu [30]

Některé typy gelů vykazují při smykovém namáhání tixotropní vlastnosti. Nejprve gely vykazují vysokou zdánlivou viskozitu, která se působením smykového namáhání postupně snižuje. Ponecháme-li gel v klidu, dochází k obnovení původní struktury a hodnota zdánlivé viskozity se opět postupně zvyšuje a přibližuje k původní hodnotě. Při smykovém namáhání dochází nejprve k porušení nejméně pevných vazeb, proto tyto vlastnosti vykazují gely s různou pevností uzlů. Dochází tak k rozpadu gelu na velké celky, které už nejsou schopny vrátit se do původního stavu a vytvořit původní gel. Existuje však i opačný jev, kdy mechanické namáhání způsobuje vznik gelu, v tomto případě hovoříme o reopexii [31].

Působíme-li deformačním napětím dostatečně rychle, elasticita se projeví i u plynů a vody a mezi viskoelastické látky, tak můžeme zařadit v podstatě všechny materiály. Reologické vlastnosti materiálů charakterizuje tzv. *Debořino číslo*

$$De = \frac{T}{\Delta t}, \quad (14)$$

kde T vyjadřuje materiálový čas a Δt délku trvání deformačního procesu. Pro ideálně neelastické kapaliny je $T = 0$ a De tedy také nula. Pro ideálně elastické materiály je T i De rovno nekonečnu. Při nízkých hodnotách De se látky chovají jako vazké kapaliny, při vysokých hodnotách jako pružná tělesa [31].

3.6.2 Viskoelastické testy

Tzv. *viskoelastických testů* se využívá při zkoumání mechanických vlastností různých látek. Viskoelastické vlastnosti různých materiálů mohou být zjišťovány těmito typy viskoelastických testů:

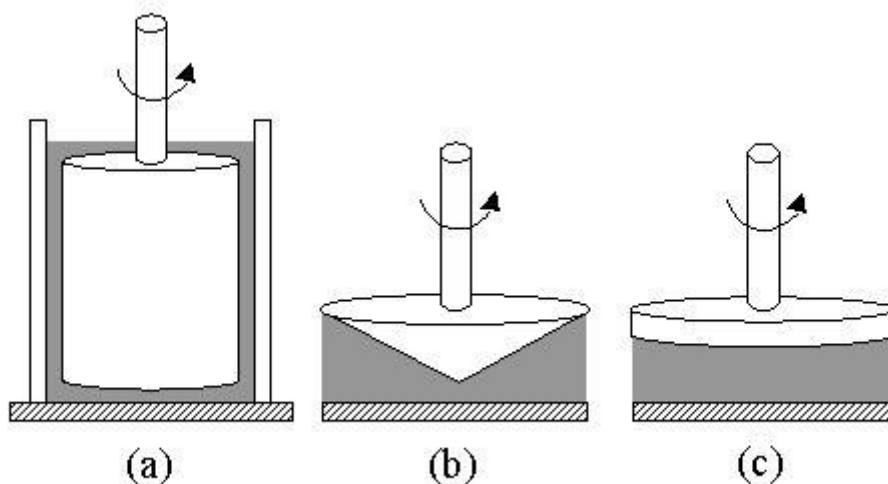
- Statické testy (Creep test)
- Dynamické testy
 - Relaxační testy
 - Oscilační testy
 - Frekvenční test
 - Amplitudový test

Dále existují také *tokové testy*, které se používají ke klasickému stanovení viskozity. K měření viskozity se běžně používají průtokové, pádové a rotační viskozimetry, z nichž však pouze poslední typ a speciální kapilární viskozimetry umožňují dostatečně charakterizovat tokovou křivku nenewtonských kapalin. Podmínkou správného měření je vždy laminárnost proudění v celém rozsahu měření a dobře definovaná geometrie toku v případě nenewtonských kapalin.

Zkoumány jsou následující veličiny:

- *komplexní viskozita* [Pa·s]
- *elastický modul* G' [Pa]
- *viskózní modul* G'' [Pa]
- *ztrátový úhel* δ : $\tan \delta = \frac{G''}{G'}$, udává míru viskoelasticity vzorku, elastický materiál by měl mít hodnotu ztrátového úhlu $\delta = 0^\circ$ a ideálně viskózní látka $\delta = 90^\circ$.

U *oscilačních testů* je vzorek umístěn do prostoru mezi senzor a spodní desku. Senzor je na rozdíl od spodní desky schopen oscilace, spodní deska zůstává stacionární. Druhy měřicí geometrie jsou uvedeny na obrázku 9, jejich použití se liší dle povahy vzorku. Měřicí geometrie typu *deska – deska* (uvedená na obrázku 9 (c)) se používá výhradně pro velmi tuhé vzorky. Měřicí geometrie typu *kužel – deska* (uvedená na obrázku 9 (b)) se vyznačuje různým úhlem zkosení kuželu (v rozsahu 1° až 4°) a je vhodná pro kapalnější vzorky. Poslední druhem je měřicí geometrie typu *válec – válec*, která je ideální pro velmi kapalné vzorky. Existují také tzv. *double gap*, které se řadí k typu *válec – válec*, ale je zde výrazně menší objem vzorku.



Obrázek 9: Druhy měřící geometrie reometru [31]

Senzor osciluje s přesně definovanou frekvencí otáčení prakticky vždy od nejvyšší frekvence po nejnižší. Měřený vzorek je vystaven působení konstantního napětí.

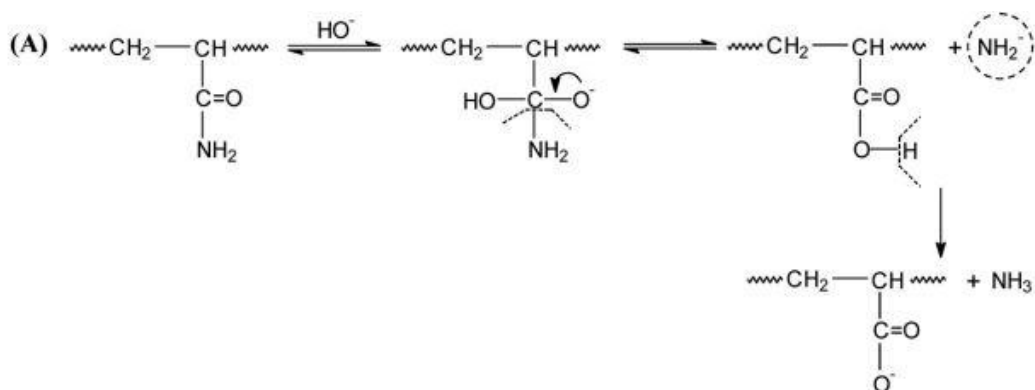
Druhy oscilačních testů:

- *Frekvenční test* je založen na studiu viskoelastických vlastností při měnící se frekvenci oscilací a konstantní amplitudě deformace (amplitudu deformace je nutno vybírat z lineární viskoelastické oblasti (LVO), aby nedocházelo k výrazným deformacím vzorku).
- *Amplitudový test* je založen na konstantní frekvenci oscilací a měnící se amplitudě deformace. Díky tomuto testu lze určit oblast lineární viskoelastivity (LVO). Zde je odezva vzorku elastická.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

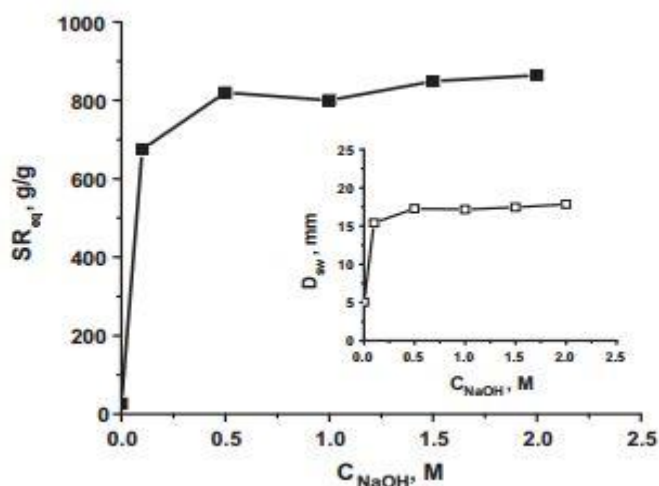
4.1 Chitosanové hydrogely

Přípravou a charakterizací hydrogelových polymerních sítí na bázi polyakrylamidu a chitosanu se zabýval kolektiv autorů Dragan et al. v referenci [32]. Autoři zde zkoumali vliv poměru vytvořených vazeb, pH reakční směsi a molární hmotnosti na morfologii vytvořených hydrogelů. Obsah chitosanu ve vytvořeném hydrogelu narůstal a stával se tak „dostupnějším“ se zvyšujícím se pH, které dosahovalo hodnot 5 až 6. Hydrogely byly připraveny postupným procesem. Nejprve byl připraven hydrogel tvořený semipenetrujícími polymerními sítěmi, které jsou v molekulárním měřítku navzájem částečně propojeny (s-IPN hydrogel). Poté došlo k zesíťování chitosanu s epichlorhydrinem v prostředí 2 M roztoku NaOH. Částečná hydrolýza skupin amidů při vysokém pH vedla k vytvoření hydrogelů s plně penetrujícími polymerními sítěmi (d-IPN hydrogely). Výsledkem byly hydrogely d-IPN s kladně nabitou chitosanovou sítí a záporně nabitou polyakrylamidovou sítí, které po hydrolýze obsahovaly karboxylovou skupinu vedle amido skupiny. Schéma hydrolýzy je zobrazeno na obrázku 10.



Obrázek 10: Schéma hydrolýzy [32]

Bobtnavost vytvořených hydrogelů a jejich interakce s iontovými barvivy byla silně ovlivněna přítomností dvou rozdílně nabitých funkčních skupin. Což znamená, že s - IPN hydrogel, který obsahoval pouze kladně nabité skupiny, sorboval větší množství anionaktivního barviva (C.I. 34140) než hydrogel d - IPN. Zatímco d - IPN hydrogel sorboval mnohem větší množství kationaktivního barviva (methylenová modř) než s - IPN hydrogel. Jak je patrné z obrázku 11 bobtnací poměr (přírůstek hmotnosti na každý gram původní hmotnosti hydrogelu) se velmi zvyšuje od hodnoty 27 g/g (přírůstek hmotnosti na každý gram hydrogelu činil 27 g), měřené před hydrolýzou, až do 800 g/g měřené po sedmi hodinové hydrolýze v 0,5 M vodném roztoku NaOH. Od hodnoty koncentrace 0,5 M NaOH je již tento poměr méně ovlivňovaný zvyšováním koncentrace NaOH až ke 2 M NaOH.

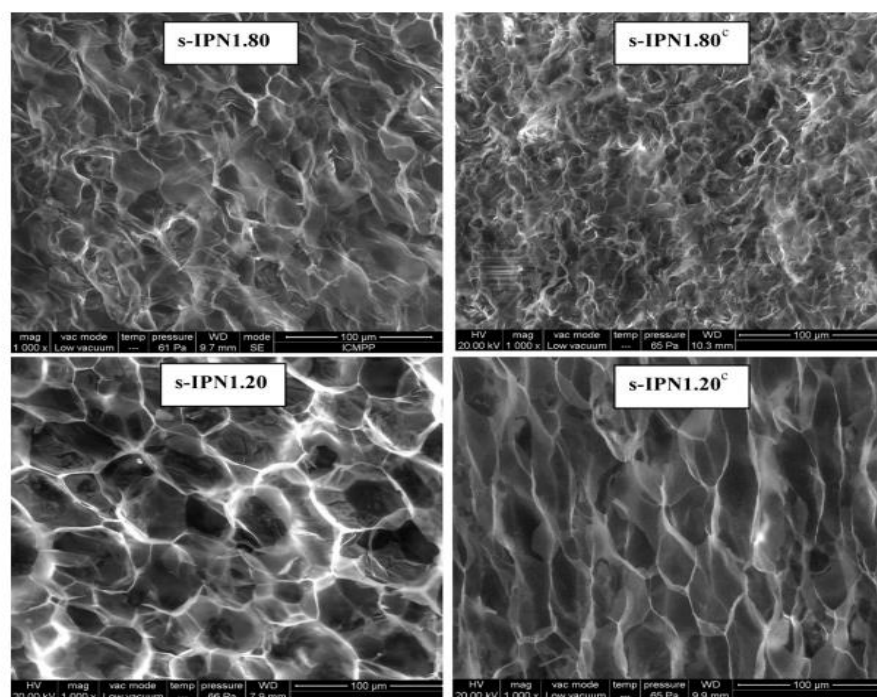


Obrázek 11: Graf závislosti bobtnacího poměru na koncentraci NaOH [32]

Také je patrné, že průměr nabobtnalých částic se zvýšil z původních 5 μm před hydrolýzou na 17,5 μm po hydrolýze v 0,5 M vodném roztoku NaOH. Velikost částic byla měřena pomocí environmentální skenovací elektronové mikroskopie (ESEM). Se zvyšováním koncentrace NaOH rostl průměr částic méně. Tyto výsledky potvrzují změny struktury, které se objevily v polyakrylamidu během síťování s chitosanem za alkalických podmínek. Dále potvrzují, že koncentrace NaOH má silný vliv na hydrolýzu amido skupin pouze do hodnoty koncentrace 0,5 M.

Vlastnosti vytvořených lyofilizovaných hydrogelů byly prověřeny metodou SEM analýzy (skenovací elektronová mikroskopie). Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se poměrem vytvořených vazeb mezi jednotlivými polymerními řetězci byly póry lépe definovány. Morfologie byla nejzachovalejší při nejvyšší hodnotě síťovacího poměru X $\left(X = \frac{1}{20}\right)$.

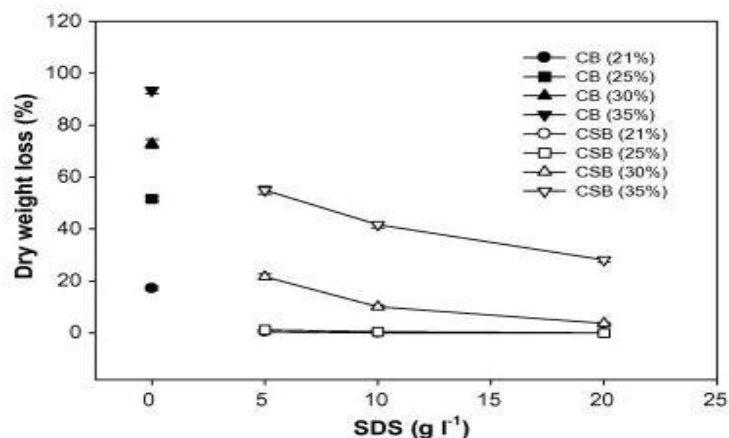
Na obrázku 12 se na levé straně nacházejí hydrogely vytvořené při pH = 5, na pravé straně při pH = 6. Je zřejmé, že při stejné hodnotě síťovacího poměru X se hydrogely vytvořené při pH = 6 jeví jako celistvější. Tento jev je přisuzován poklesu ionizačního stupně chitosanu, kdy se pH reakční směsi blíží hodnotě pKa chitosanu. Proto se chitosanové řetězce vyznačovaly tužšími stěnami, menšími póry a byly také rigidnější.



Obrázek 12: Mikrostruktury vytvořených hydrogelů pomocí SEM [32]

Nový typ chitosanových perel (CSB) vytvořených gelací dodecylsulfátu sodného (SDS) je popsán v referenci [33]. Tento typ hydrogelu je tvořen hustou membránou a vykazuje mírně vyšší mechanickou pevnost a odolnost vůči kyselinám oproti chitosanovým gelům vyráběným alkalickou gelací. Proces tvorby začíná přikapáváním chitosanového roztoku k roztoku dodecylsulfátu sodného o koncentraci v rozmezí 2 – 50 g/l. Nedochází k okamžitému smíchání, jelikož chitosanové perly jsou viskózní. Opačně nabitě povrchově aktivní látky (SDS) a polyelektrolyt (chitosan) se dostávají do kontaktu pomocí difúze přes rozhraní roztoku povrchově aktivní látky a polyelektrolytu. Na rozdíl od hlubokého proniknutí OH^- iontu do chitosanové perly během alkalické gelace dochází ke tvorbě polyelektronového komplexu pouze na rozhraní vzhledem k velikosti molekuly povrchově aktivní látky a vytváří se tak gelová kapsle okolo chitosanové perly. Vytvořená síť je stabilizována kombinací elektrostatických, iontově-dipólových a hydrofobních interakcí. Bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací SDS vznikají rigidnější chitosanové perly.

Hmotnostní úbytek po aplikaci ultrazvuku, ze kterého je usuzována mechanická odolnost chitosanových perel, je znázorněn na obrázku 13. Nový typ perel vykazuje s narůstající koncentrací SDS při gelaci mnohem menší hmotnostní úbytek po aplikaci ultrazvuku než perly vyráběné alkalickou gelací, což naznačuje, že perly vyráběné SDS gelací jsou mechanicky odolnější. Procentuální úbytek hmotnosti po aplikaci ultrazvuku se snižuje s nárůstem koncentrace SDS.

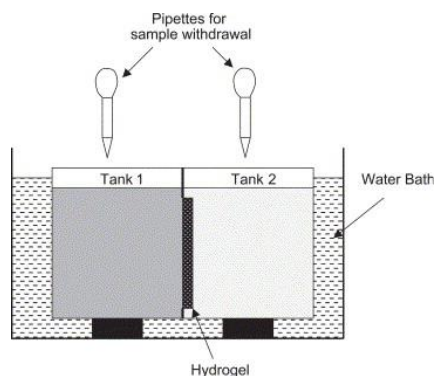


Obrázek 13: Graf mechanické odolnosti chitosanových kuliček [33]

Zkouška odolnosti vůči kyselinám prokázala, že hmotnostní úbytek se zvyšuje se snižujícím se pH roztoku. U perel vytvořených klasickou alkalickou gelací byla odolnost vůči kyselinám při pH = 2 poměrně špatná, kdežto u perel vytvořených SDS gelací (koncentrace SDS 5 g·dm⁻³) nebyl prokázán žádný hmotnostní úbytek.

Perly vytvořené SDS gelací také prokazují mnohem větší adsorpční schopnost a to zřejmě díky hydrofobním interakcím mezi SDS a použitým barvivem Kongo červení. Objemová adsorpční kapacita se zvýšila z 0,023 g·cm⁻³ pro kuličky vyráběné alkalickou gelací na 0,45 g·cm⁻³ pro nový typ. Tyto adsorpční schopnosti by bylo možné využít především v oblasti čištění odpadních vod.

Reference [34] popisuje přípravu makroporézního chitosanového hydrogelu pro studium difúzního koeficientu u analgetika paracetamolu. Difúzní koeficient byl stanoven pomocí diafragmové difúzní cely. Cella se skládá ze dvou komor oddělených cca 1,5 mm tenkou vrstvou chitosanového hydrogelu. První komora obsahovala roztok paracetamolu ve vodě o známé koncentraci a ve druhé komoře se nacházela filtrovaná deionizovaná voda. Obě komory byly umístěny do vodní lázně s konstantní teplotou a rychlostí míchání 50 ot./min. Pipetou byly pravidelně odebírány vzorky z obou komor, které byly analyzovány pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) k určení přesné koncentrace paracetamolu v čase. Data byla získána při teplotách 0, 25, 37 a 60 °C.



Obrázek 14: Diafragmová difúzní ceta [34]

Chitosan byl připravován rozpuštěním v 0,2 M roztoku kyseliny octové, experimenty byly provedeny s koncentrací roztoku mezi 1 až 5 hm. % chitosanu. Z roztoků byly připraveny xerogely, které byly zpětně rehydratovány v roztoku etanolu a vody. Po rehydrataci byla změřena tloušťka každého gelu laserovým mikrometrem a povrch hydrogelu byl zkoumán skenovací elektronovou mikroskopií. K určení vlastností pórů byly použity metody obrazové analýzy. Bylo zjištěno, že se vzrůstající koncentrací chitosanu se struktura stává rigidnější a průměrná velikost pórů snižuje (viz tabulka 3). Celkový difúzní koeficient se pohybuje mezi $0,1$ až $5,0 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$ a je silně závislý na velikosti pórů v chitosanovém hydrogelu. U chitosanu hrají póry důležitou roli zejména při transportu rozpuštěných látek v důsledku přítomnosti kladného náboje. V případě paracetamolu může dojít k vytvoření iontového komplexu mezi deprotonovanou rozpuštěnou látkou a molekulou chitosanu, což může omezit klasický difúzní transport.

Tabulka 3: Průměrná velikost pórů a difúzní koeficient [34]

w chitosanu [hm. %]	Průměrná velikost pórů [μm]	Difúzní koeficient $D \cdot 10^{-8}$ [m^2/s]
1	240	$4,45 \pm 0,34$
2	98	$1,87 \pm 0,27$
3	65	$0,30 \pm 0,06$
5	25	$0,08 \pm 0,01$

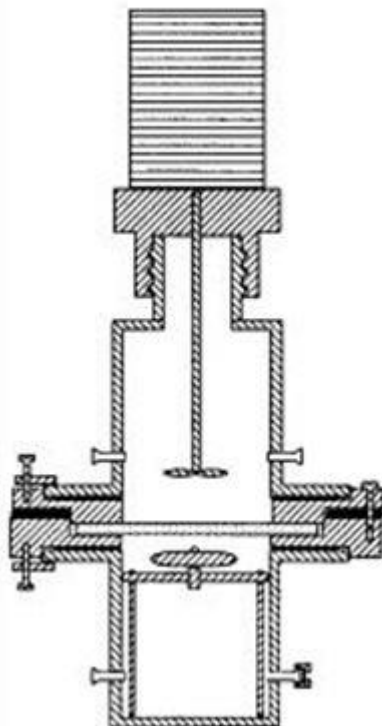
Autoři Pa a Yu zkoumali v referenci [35] vliv koncentrace kyseliny octové, ve které je chitosan rozpustný, na zastoupení aminových skupin chitosanu. Roztoky o koncentracích 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 a 0,9 mg/ml byly připraveny rozpuštěním chitosanu v roztoku kyseliny octové. Každý takto připravený roztok byl proměřen při těchto hodnotách pH: 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 a 3,5. Autoři dospěli k závěru, že velikost částic chitosanových molekul se s klesajícím pH zvyšuje. Naměřená data také ukazují, že se snižující se koncentrací kyseliny octové ve vodných roztocích chitosanu se zvyšuje koncentrace aminových skupin. Zvýšení koncentrace aminových skupin zlepšuje rozpustnost chitosanu ve vodě.

4.2 Difúze v difúzních celách

Autoři Ibrahim a Kasting v referenci [36] zkoumali metodou difúzních cel penetraci parathionu v přítomnosti rozpustných proteinů přes pokožku. Ukázalo se, že tato metoda je důležitá pro výzkum prostupnosti látek, u nichž je více než 87 % rozpustných proteinů vázáno v pokožce. Difúzní koeficient albuminu dosahoval hodnot v rozmezí od $0,11 \cdot 10^{-7}$ do $5,8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

V referenci [37] se autoři věnují stanovení difúzních koeficientů metodou difúzních cel u hovězího sérového albuminu (BSA) a lysozomů. Autoři dosáhli přesných výsledků, a to za poměrně krátkou dobu. Vliv pH a iontové síly na difúzní koeficienty proteinů

v roztocích byl prokázán jako relevantní i pro difúzi v agarózovém gelu. Na obrázku 15 je zobrazena použitá difúzní cela, spodní část byla při každém měření naplněna roztokem proteinu, horní část destilovanou vodou o určitém pH a iontové síle. Mezi tyto části je umístěn hydrogel. V obou částech bylo pH a iontová síla stejné. Objem každé části je 59 ml, pro experiment není důležité, aby byla komora s destilovanou vodou naplněna úplně, avšak je nezbytné, aby roztok proteinů byl v kontaktu s hydrogelem. Vzorky byly odebírány z horní části a analyzovány prostřednictvím UV spektrofotometru. Po skončení analýzy se vzorky vrací zpět do cely z důvodu udržení konstantního objemu.



Obrázek 15: Použitá difúzní cela [37]

Agarózové hydrogely byly připraveny rozpuštěním 0,4 g agarózy v 9,6 ml destilované vody. Směs byla zahřívána na 90 °C ve vodní lázni. Roztoky byly zahřívány po dobu 30 minut, aby se předešlo tvorbě bublin v hydrogelech. Roztok byl poté odlit do forem z plexiskla, které byly umístěny mezi skleněné desky. Skleněné desky byly rovněž zahřívány s cílem zabránit urychlené gelaci. Po ztuhnutí je hydrogel vyjmut z formy.

Použitými proteiny byly BSA o koncentraci 10 mg/ml a lysozym o koncentraci 1 mg/ml. Koncentrace BSA byla vyšší z důvodu vyšší molekulové hmotnosti BSA. Experimenty byly provedeny při nízké iontové síle (nižší než 0,005 M) a s přidavkem 0,1 M NaCl. Jedním z problémů u difúze proteinů je časová náročnost, jelikož difúze probíhá pomalu. Experiment probíhal 100 hodin pro Lysozym a 200 hodin pro BSA. Měření po prvních hodinách vykazovala velkou přesnost, po delším časovém úseku téměř vždy klesal difúzní koeficient, což mohlo být způsobeno konformační změnou proteinu nebo růstem bakterií. Lepších výsledků by se dosáhlo automatizací měření.

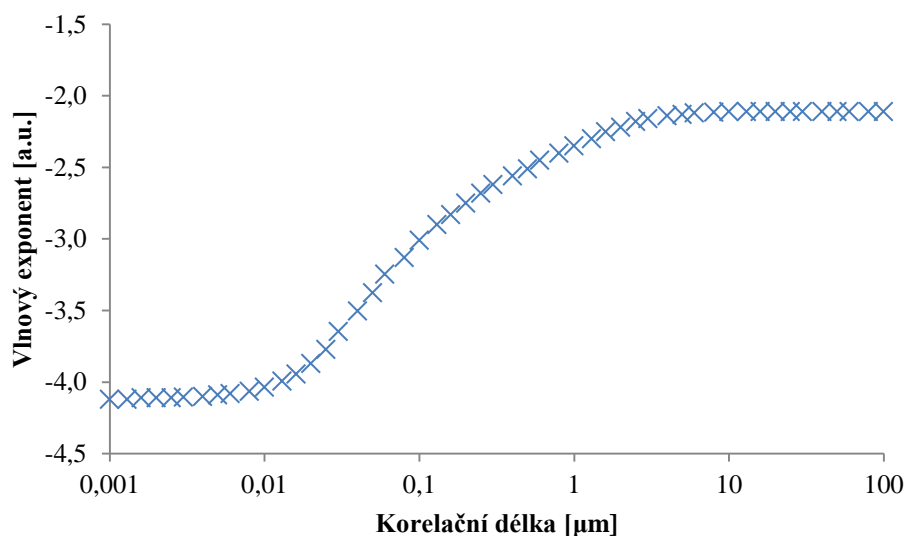
V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky měření. Dle očekávání je difúzní koeficient lysozymu při nízkém pH a nízké iontové síle relativně vysoký, což je způsobeno coulombovskými interakcemi mezi nabitými molekulami proteinů. Tento jev lze potlačit zvýšením iontové síly (0,1 M NaCl), kdy dochází k neutralizaci. Navíc po přidavku 0,1 M NaCl nevzniká žádný výrazný rozdíl mezi hodnotami difúzního koeficientu při rozdílných hodnotách pH. Lysozym je při hodnotě pH 11 neutrální, což vysvětluje stejné hodnoty difúzního koeficientu s přidavkem soli i bez něj. BSA vykazuje nejvyšší difúzní koeficient ve svém isoelektrickém bodě, tedy při pH 5,6. Snížení difúzního koeficientu s nárůstem iontové síly je v souladu s předešlými výzkumy.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty difúzního koeficientu [37]

Protein	Difúzní koeficient ($\times 10^{-11}$) [m ² /s]		
	pH 4	pH 5,6	pH 11
Lysozym s nízkou iontovou silou			
Experiment 1	22,3	22,4	9,1
Experiment 2	20,6	20,9	8,6
Lysozym s přidavkem 0,1 M NaCl			
Experiment 1	10,4	10,4	9,6
Experiment 2	10,4	12,8	10,4
BSA s nízkou iontovou silou			
Experiment 1	4,8	6,5	4,7
Experiment 2	5,0	6,1	6,4
BSA s přidavkem 0,1 M NaCl			
Experiment 1	2,5	3,3	2,6
Experiment 2	2,4	3,4	2,3

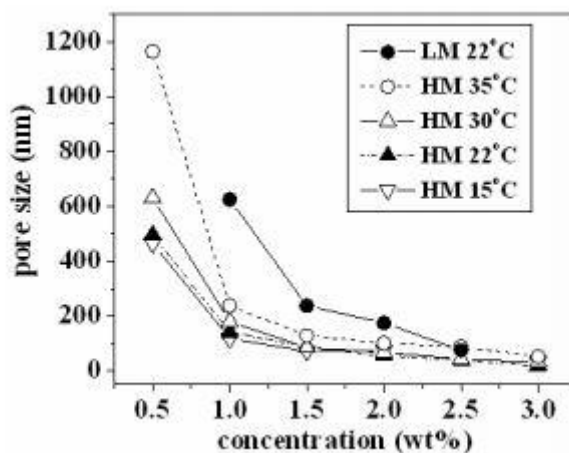
4.3 Stanovení velikosti pórů přítomných v hydrogelech

Autoři Narayanan, Xiong a Liu se zabývají v referenci [38] novou metodu stanovení velikosti pórů v agarózových hydrogelech v závislosti na množství obsažené agarózy a na teplotě. Agarózové roztoky byly připraveny rozpuštěním navážky agarózy v destilované vodě, konkrétně se jednalo o 1 hm.%, 2 hm.% a 4 hm.%, a zahřátím na rozpouštěcí teplotu agarózy. Následně byly horké roztoky umístěny do ultrazvuku po dobu jedné hodiny a poté zahřáty po dobu 30 minut. Horké roztoky byly okamžitě nality do kyvet a ochlazený na požadované teploty. Poté byly změřeny absorpční spektra v rozmezí 700 – 800 nm na UV-VIS spektrofotometru Cary 50. Poté byla vypočítána *turbidita* pomocí vzorce: $\tau(\lambda) = 2,3 \cdot A(\lambda)/L$, kde veličina A představuje absorbanci a veličina L optickou dráhu, která je u tohoto měření 1 cm. Následně byl sestaven graf závislosti dekadického logaritmu *turbidity* na logaritmu vlnové délky. Ze směrnice této přímky byl určen vlnový exponent. Reference [39] popisuje závislost vlnového exponentu na korelační délce, tato závislost je znázorněna na následujícím grafu, viz obrázek 16. Z korelační délky poté již zjistíme velikost pórů, jelikož jsou přímo úměrné.



Obrázek 16: Závislost vlnového exponentu na korelační délce [39]

Závislost velikosti pórů na koncentraci připraveného hydrogelu a jeho teplotě je uvedena na obrázku 17. Ukázalo se, že velikost pórů se s rostoucí teplotou zvyšuje v důsledku porušení slabých vazebných interakcí. Naopak se zvyšující se koncentrací agarózy v připraveném hydrogelu se velikost pórů zmenšuje především kvůli zvýšené rychlosti nukleace.



Obrázek 17: Závislost velikosti pórů na koncentraci hydrogelů [38]

Metoda stanovení velikosti pórů na základě měření absorbance je rychlá, méně komplikovaná a vhodnější pro koncentrované vzorky oproti metodám běžně používaným ke stanovení velikosti pórů např. pomocí porozimetru.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

chitosan, Sigma Aldrich Co., střední molekulová hmotnost

agaróza, Sigma Aldrich Co., pro běžné použití

Coomassie Brilliant Blue R-250 (C.I. 42655), Gibco BRL

saturnová modř LBRR (C.I. 34140), Sigma Aldrich Co.

methylenová modř (C.I. 52015), Sigma Aldrich Co.

kyselina octová, 99 %, p.a., Verkon

destilovaná voda

5.2 Použité přístroje

UV-VIS spektrofotometr Varian Cary 50

UV-VIS spektrometr Hitachi U-3300

difúzní cela PermeGear Inc.

topná deska ETA

analytické váhy Sealtec SBC 31

přenosný digitální teploměr GMM 175 Greisinger

reometr AR-G2 TA Instruments

spektrofotometrické sondy, detektory, zdroje světla, software od společnosti OceanOptics

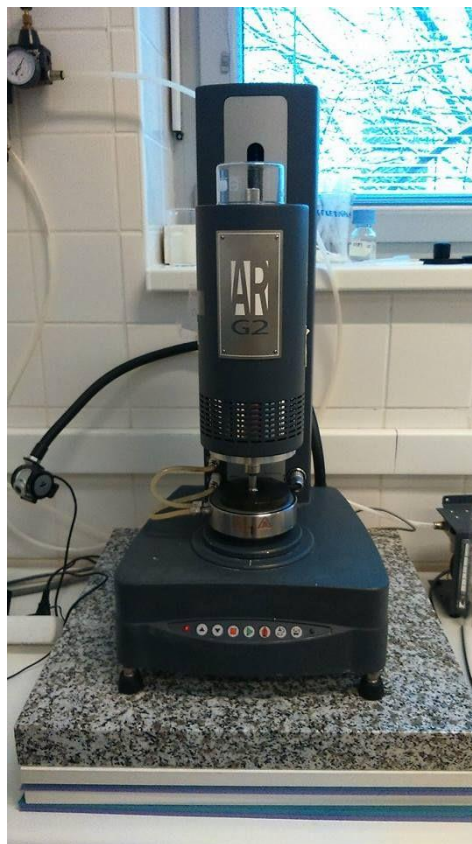
magnetické míchačky Variomag Poly a Heidolph MR HEI-Standard

5.3 Charakterizace materiálů

5.3.1 Studium viskoelastických vlastností hydrogelů

Studium viskoelastických vlastností je důležitou charakteristikou hydrogelových vzorků. Na reometru AR-G2 TA Instruments, viz obrázek 18, byly provedeny dva typy oscilačních testů (frekvenční a amplitudový). Frekvenční test je založen na studiu viskoelastických vlastností při měnící se frekvenci oscilací a konstantní amplitudě (při volbě amplitudy je nutno dbát zvýšené opatrnosti, aby nedocházelo k výrazným deformacím vzorku, z tohoto důvodu musí být proveden jako první test deformační, abychom zjistili rozsah deformací, který spadá do lineární viskoelastické oblasti (LVO)). Druhým testem je amplitudový test, který je založen na konstantní frekvenci oscilací a měnící se amplitudě deformace. Díky tomuto testu lze určit oblast lineární viskoelastivity (LVO). Pro studium viskoelastických

vlastností agarózových gelů s různým přídavkem biopolymeru byl použit titanový senzor typu deska/deska s průměrem 40 mm, tento typ senzoru se používá ve většině případů pro polotuhé vzorky.



Obrázek 18: reometr AR-G2 TA Instruments

Těmto reometrickým měřením byly podrobeny 1 hm. % agarózové gely s přídavkem různého množství použitého chitosanu i čistý agarózový gel, který sloužil jako reference. A to z důvodů zjištění možných rozdílů v mechanických vlastnostech, které mohou mít zásadní vliv na průběh difúze.

Frekvenční test byl prováděn při konstantní amplitudě $\gamma = 1 \%$. Při této amplitudě bylo experimentálně zjištěno, že nedochází k výrazné deformaci vzorku, což bylo ověřeno na základě amplitudového testu. Rozsah frekvencí byl zvolen $f = 0,01 \text{ Hz} - 20 \text{ Hz}$. Frekvenční test probíhal při teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amplitudový test byl prováděn za konstantní frekvence $f = 1 \text{ Hz}$ a amplituda byla volena v rozmezí $\gamma = 0,1 \% - 100 \%$. Amplitudový test probíhal při teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

U všech vzorků byl zjišťován elastický modul G' [Pa], viskózní modul G'' [Pa], komplexní viskozita η^* [Pa·s]. Z poměru elastického a viskózního modulu lze vypočítat ztrátový úhel δ :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (7)$$

Před začátkem experimentu byl každý vzorek temperován při teplotě měření a docházelo k jeho relaxaci v tzv. *Conditioning step*, po dobu 5 minut.

5.3.2 Stanovení velikosti pórů v hydrogelu

Metoda stanovení velikosti pórů vychází z metody popsané v kapitole 4.3. Experiment probíhal následovně: byly připraveny roztoky o různé koncentraci chitosanu (konkrétně 0,000; 0,001; 0,009 a 0,010 hm. %) a konstantní koncentraci agarózy (1 % hm.). Roztoky byly zahřáty na teplotu 85 °C a následně byly horké roztoky nality do kyvet. Celkem bylo připraveno deset kyvet, po dvou vzorcích od každé koncentrace.

Poté byla změřena absorpční spektra jednotlivých vzorků na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 50 v rozmezí vlnových délek 700 – 800 nm. Naměřené hodnoty absorbance byly přepočteny na *turbiditu* dle vzorce $\tau(\lambda) = 2,3 A(\lambda)/L$. Následně byl sestaven graf závislosti logaritmu turbidity na dekadickém logaritmu vlnové délky. Tato závislost byla proložena lineární spojnici trendu a ze směrnice této závislosti byla dle obrázku 16 zjištěna korelační délka, která odpovídá velikosti pórů.

5.4 Příprava difúzních experimentů

5.4.1 Příprava difúzního experimentu za účelem výběru vhodného anionaktivního barviva

Prvním krokem před započítím difúzních experimentů v difúzních celách byl výběr vhodného anionaktivního barviva. Jednalo se pouze o pilotní experiment za účelem prověření možných interakcí, proto zde nebylo nutné sestavení kalibrační přímky. Na základě vědeckých článků zabývajících se difúzí v chitosanových hydrogelech byla vybrána dvě potenciálně vhodná barviva, a to saturnová modř LBRR a Coomassie Brilliant Blue R-250. Jejich interakce s chitosanovým hydrogelem byla porovnána prostřednictvím následujícího experimentu. Byly připraveny zásobní roztoky těchto dvou barviv o požadované absorbanci $A = 1$. U barviva LBRR to odpovídalo koncentraci $c = 0,02 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, u barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 koncentraci $c = 0,04 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále byly připraveny 3 typy roztoků, viz tabulka 5, ze kterých byly zahřátím a následným tuhnutím připraveny hydrogely.

Tabulka 5: Složení připravených hydrogelů

	Množství agarózy [% hm.]	Roztok chitosanu [% hm.]
1. typ hydrogelu	1	0,000
2. typ hydrogelu	1	0,005
3. typ hydrogelu	1	0,010

Hydrogely byly připraveny do skleněných trubiček o rozměru 1·1 cm, které sloužily jako formy a umístěny do uzavíratelné plastové nádoby obsahující 10 ml daného barviva a spolu s magnetickým míchadlem byly umístěny na magnetickou míchačku. Rychlost míchání byla nastavena na hodnotu 250 ot./min.

Roztoky barviv byly v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin proměřovány pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary-50 v oblasti vlnových délek 300 – 900 nm.

5.4.2 Příprava difúzního experimentu v diafragmové difúzní cele

Jako nosná polotuhá matrice pro studium reaktivity chitosanu byla zvolena agaróza, a to především díky své schopnosti termoreverzibilní gelace. Její hlavní výhoda spočívá v tom, že se jedná o prakticky zcela nenabítený polysacharid, který ovšem může obsahovat příměsi nabitých sulfátových a pyruvátových skupin. Mezi její další výhody patří dobrá optická průchodnost, jednoduchá příprava a také fakt že difúzní procesy nejsou v hydrogelových médiích ovlivňovány konvekcí a prouděním. Z výše uvedeného výčtu vlastností vyplývá, že agaróza je vhodná pro použití při studiu reaktivity vybraných polymerních látek

Samotná příprava agarózových gelů použitých pro difúzní experimenty v difúzních celách byla provedena dle nadcházejícího postupu. Difúzní experimenty byly provedeny v 1 hm. % agarózovém gelu s různým přídavkem chitosanu. Do kádinky s 10 ml roztoku bylo kvantitativně převedeno dané množství práškové agarózy (0,1 g). Následně byl celý systém zahříván na teplotu 85 °C, která odpovídá teplotě gelace agarózy, až do jejího úplného rozpuštění. Poté byl horký roztok nalit do plastové formy, viz obrázek 19, která byla opatřena sklíčky, aby došlo k vytvoření hladkého povrchu gelu a také z důvodu zamezení zbytečného odpařování z roztoku a tím pádem zakoncentrovávání agarózového gelu. Poté byl gel ponechán k tunutí volně na vzduchu po dobu 45 minut, která musí být dodržena především z důvodu vytvoření pevné hydrogelové sítě.



Obrázek 19: Připravený hydrogel v plastové formě

Pro přípravu agarózových gelů s přídavkem chitosanu byl také připraven zásobní roztok chitosanu o koncentraci $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ následujícím způsobem. Na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa bylo naváženo 0,01 g chitosanu. Navážka chitosanu byla rozpuštěna ve 100 ml 5 hm. % kyselině octové. Do roztoku bylo vloženo magnetické míchadélko a roztok byl ponechán na magnetické míchačce po dobu 24 hodin. Čerstvý roztok

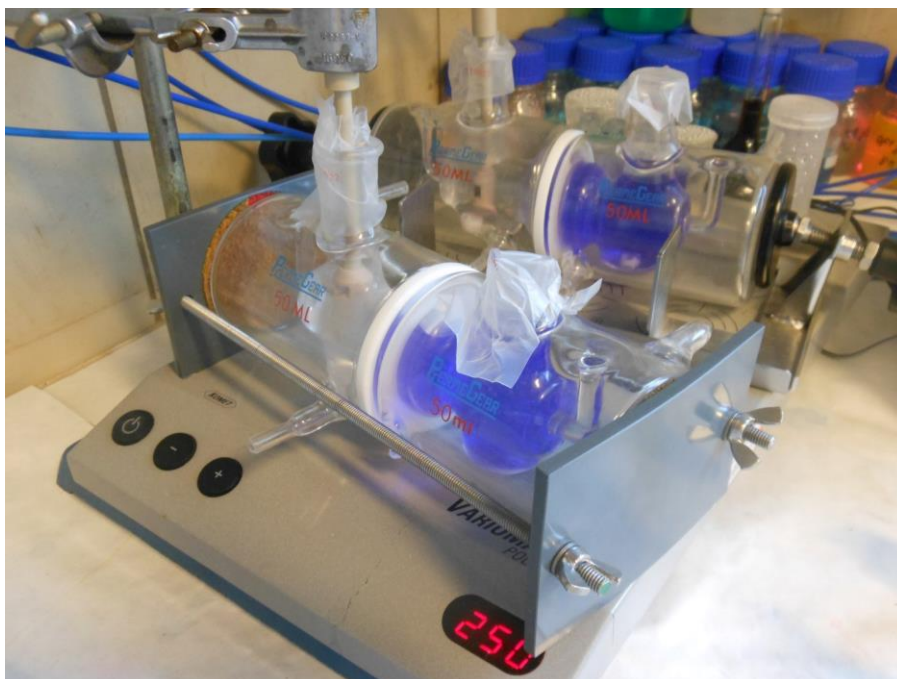
chitosanu byl připravován jednou měsíčně, aby nedocházelo k ovlivňování difúze vlivem degradace roztoku biopolymeru.

Po dokonalém zgelovatění roztoku byl gel v plastové formě umístěn mezi dvě komory horizontální difúzní cely (PermeGear, Inc.). Styčné plochy hydrogelu a plastové formy byly namazány zábrusovým tukem za účelem utěsnění. Poté byly obě difúzní komory s opatrností spojeny tak, aby nedošlo k vypadnutí připraveného hydrogelu z formy. Do každé komory difúzní cely bylo umístěno magnetické míchadélko, následně byla tato cela umístěna na vícemístnou magnetickou míchačku, rychlost míchání byla nastavena na hodnotu 250 ot./min.

Před začátkem měření v difúzních celách byl připraven zásobní roztok používaného barviva. Za difundující médium bylo zvoleno barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250 a to z toho důvodu, že chitosan coby kationaktivní biopolymer a Coomassie brilliant blue R-250 coby anionaktivní barvivo jsou schopny spolu interagovat, což tím pádem ovlivňuje rychlost difúzních procesů a z naměřených rozdílů v hodnotách difúzních koeficientů lze usuzovat o reaktivitě chitosanu.

Zásobní roztok barviva byl připraven následujícím způsobem: navážka 0,4 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (váženo na analytických vahách přesností na 4 desetinná místa) byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1 dm³, která byla naplněna destilovanou vodou po rysku. Následně byla odměrná baňka umístěna na magnetickou míchačku, kde byl roztok míchán až do úplného rozpuštění barviva. Byl získán požadovaný zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue R-250 o koncentraci 0,4 g·dm⁻³.

Měření v difúzní cele probíhalo následujícím způsobem. Do zdrojové komory difúzní cely bylo nalito 60 ml roztoku barviva a současně s roztokem barviva byl do přijímací komory nalit ekvivalentní objem destilované vody. Je důležité, aby byly oba roztoky lity do obou komor současně především kvůli hydrostatickému tlaku kapaliny, který by mohl způsobit vypadnutí agarózového gelu ze své formy. Poté byla do přijímací komory s destilovanou vodou umístěna spektrometrická sonda napojená optickými vlákny na zdroj světla a detektor (vše od firmy OceanOptics). Detektor byl propojen USB kabelem s počítačem. Komunikace s detektorem a převod dat do měřitelné podoby byla zajištěna programem SpectraSuite. Před začátkem měření musel být zdroj světla zapnut přibližně půl hodiny za účelem dosažení maximální intenzity záření. Nejprve bylo změřeno spektrum čisté destilované vody (základní linie) a poté spektrum s odpojeným detektorem za účelem eliminace šumu. Poté bylo přistoupeno k samotnému experimentu, viz obrázek 20. Jednotlivá spektra byla ukládána v půlhodinových časových intervalech automaticky v podobě textových souborů. Tyto soubory byly následně převedeny do programu MS Excel pomocí souboru s nadefinovaným makrem.



Obrázek 20: Difúzní cely v průběhu experimentu

5.4.3 Příprava difúzního experimentu za účelem neustálené difúze v kyvetách s použitím anionaktivního barviva

Byly připraveny čtyři roztoky s různou koncentrací chitosanu (konkrétně 0,000; 0,001; 0,005 a 0,010 hm. %) a konstantní koncentrací agarózy (konkrétně 1 hm. %). Roztoky byly za současného míchání zahřáty na teplotu 85°C. Horké roztoky byly nality do kyvet a ponechány zatuhnout volně na vzduchu po dobu 45 minut. Pro každou koncentraci chitosanu byly připraveny dvě kyvety, celkem tedy bylo připraveno osm kyvet.

Do skleněné difúzní nádoby obsahující 250 ml barviva Coomassie Brilliant Blue byly ponořeny čtyři kyvety s hydrogelem o různé koncentraci chitosanu. Kyvety byly do nádoby umístěny tak, aby se vzájemně nedotýkaly, aby se nepohybovaly volně po difúzní nádobě a také tak aby nebyl rušen kontakt gelu s difúzním činidlem např. vyčerpáním roztoku u tohoto rozhraní. Nádoba byla opatřena víkem z důvodu zabránění odpařování a následné změně koncentrace difúzního média.

Kyvety byly v časových intervalech 24, 48, 72 a 144 hodin od počátku experimentu proměřovány pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary-50 v oblasti vlnových délek 300 – 900 nm.

Pro sestavení kalibračních přímek byly připraveny roztoky dle tabulky 6. Roztoky byly zahřáty na teplotu 85 °C a za horka nality do plastových kyvet, které byly po zatuhnutí proměřeny na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 50 v rozmezí vlnových délek 300 – 900 nm.

Tabulka 6: Složení roztoků pro sestavení kalibračních přímek

Chitosan [% hm.]	Barvivo [% hm.]	Agaróza [% hm.]
0,000	0,001	1
0,000	0,003	1
0,000	0,005	1
0,000	0,007	1
0,001	0,001	1
0,001	0,003	1
0,001	0,005	1
0,001	0,007	1
0,005	0,001	1
0,005	0,003	1
0,005	0,005	1
0,005	0,007	1
0,010	0,001	1
0,010	0,003	1
0,010	0,005	1
0,010	0,007	1

5.4.4 Příprava difúzního experimentu za účelem neustálené difúze v kyvetách s použitím kationaktivního barviva

Za kationaktivní barvivo byla zvolena methylenová modř. Zásobní roztok tohoto barviva byl připraven následujícím způsobem: navážka 0,01 g methylenové modři (váženo na analytických vahách přesností na 4 desetinná místa) byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1 dm⁻³, která byla naplněna destilovanou vodou po rysku. Následně byla odměrná baňka umístěna na magnetickou míchačku, kde byl roztok míchán až do úplného rozpuštění barviva. Byl získán požadovaný zásobní roztok methylenové modři o koncentraci 0,01 g·dm⁻³.

Další postup stanovení difúzního koeficientu byl totožný s postupem popsáním v kapitole 5.4.3.

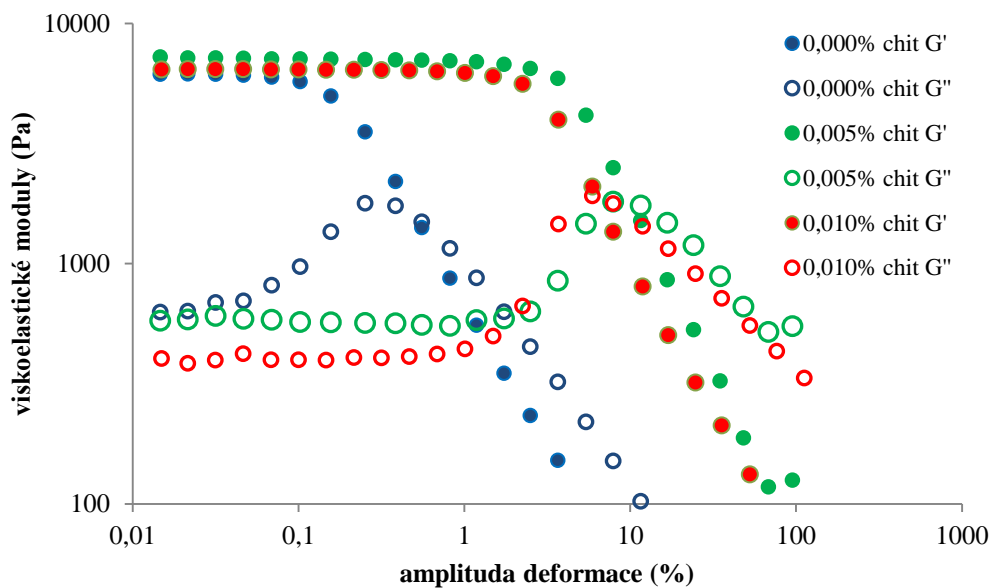
6 DISKUZE A VÝSLEDKY

6.1 Charakterizace materiálů

6.1.1 Studium viskoelastických vlastností hydrogelů s obsahem chitosanu

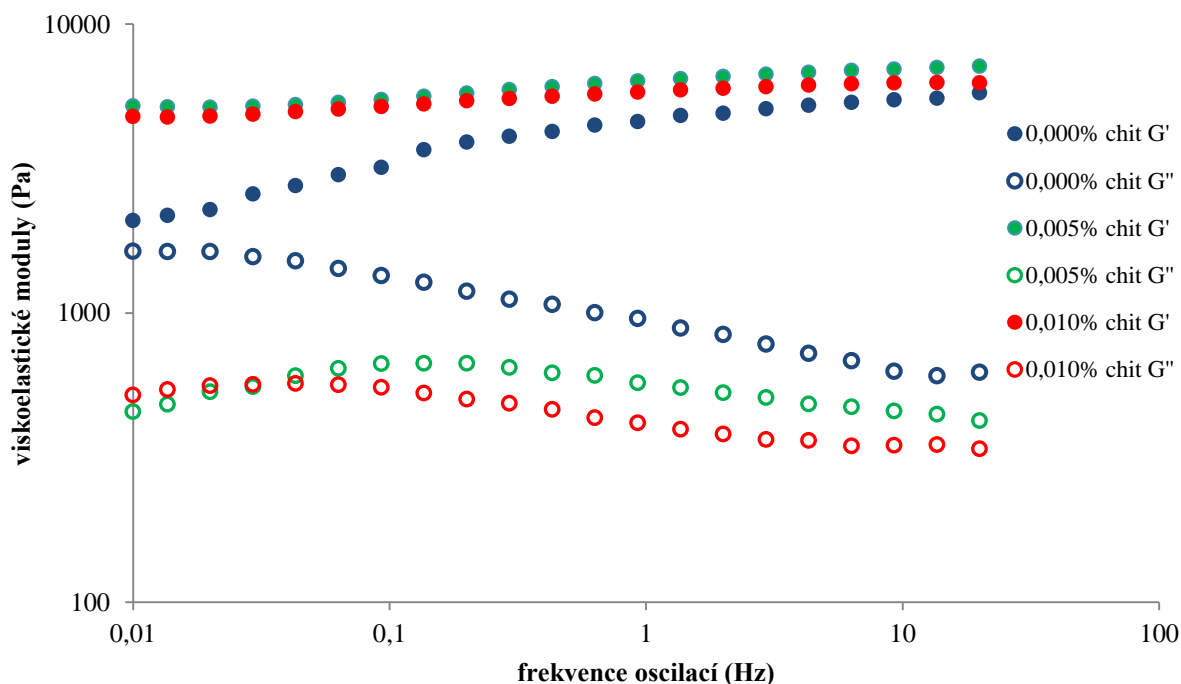
Cílem reologických měření bylo zjištění a porovnání vlivu zvyšující se koncentrace chitosanu na viskoelastické vlastnosti připravených hydrogelů. Tyto vlastnosti byly zkoumány pomocí dvou jednoduchých oscilačních testů a to amplitudového a frekvenčního. Amplitudový test, při kterém je amplituda deformace konstantní a mění se frekvence oscilací, sloužil především ke stanovení oblasti lineární viskoelasticity (LVO).

Obrázek 21 znázorňuje graf amplitudového testu pro 0,000 % hm., 0,005 % hm. a 0,010 % hm. chitosanový hydrogel. Ostatní koncentrace připravených chitosanových hydrogelů byly pro přehlednost grafu vynechány. Z grafu je patrné, že 0,005 % hm. a 0,010 % hm. chitosanový hydrogel se chovají podobně. Avšak hydrogel bez přídavku chitosanu (referenční vzorek), disponuje vyššími hodnotami viskózního i elastického modulu. Lze tedy říci, že hydrogel s vyšší koncentrací chitosanu disponuje rigidnější strukturou. Srovnáme-li připravené chitosanové hydrogely s agarózovým hydrogelem bez přídavku chitosanu, je patrné, že přídavkem chitosanu hydrogely disponují méně „poddajnější“ strukturou a vyššími hodnotami elastických modulů, naopak u viskózních modulů se jedná o hodnoty nižší. Výsledky amplitudového testu sloužily především pro určení oblasti lineární viskoelasticity (LVO). Na základě výsledků amplitudového testu byla zvolena amplituda u frekvenčního testu $\gamma = 0,1$ %. Z grafu je patrné, že po překročení této hodnoty amplitudy viskoelastické moduly strmě klesají a dochází k nevratné deformaci struktury hydrogelu. I zde je vidět velký rozdíl v hodnotě amplitudy deformace způsobený přídavkem chitosanu. U agarózového hydrogelu bez přídavku chitosanu nastává nevratná deformace struktury přibližně při hodnotě 0,38 %, kdežto přídavkem chitosanu se hodnota velmi výrazně posunuje na hodnotu 5,92 % u 0,010 % hm. a 7,91 % hm. u 0,005 % hm. chitosanového hydrogelu. Můžeme tedy říci, že přídavek chitosanu poměrně výrazně ovlivňuje rigiditu hydrogelů, což může mít vliv na transportní vlastnosti agarózových hydrogelů.



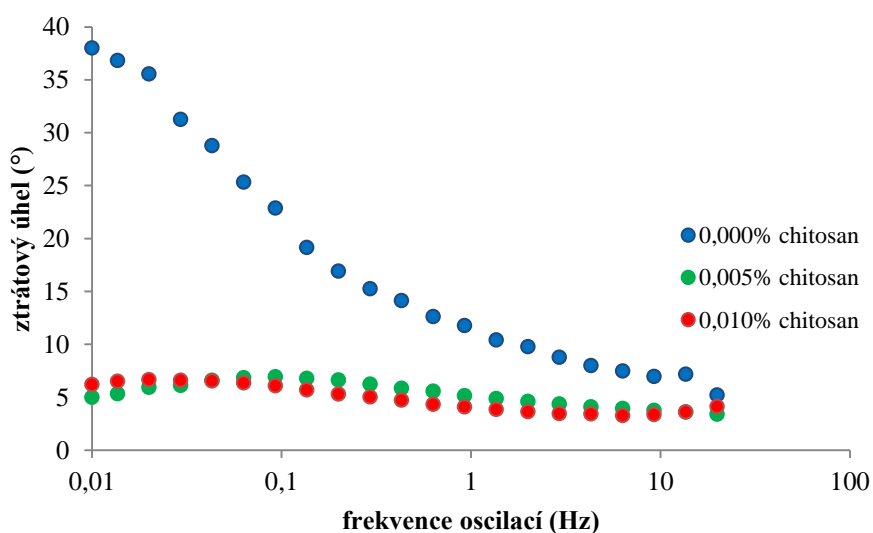
Obrázek 21: Amplitudový oscilační test pro 0,000 % hm., 0,005 % hm. a 0,010 % hm. chitosanový hydrogel (plná kolečka představují elastický modul, prázdná viskózní modul)

Druhým testem, který byl u připravených hydrogelů proveden, byl test frekvenční. Tento druh oscilačního testu je založen na konstantní amplitudě deformace a měnící se frekvenci oscilací. Obrázek 22 znázorňuje frekvenční test pro agarózový hydrogel (1 hm. %) s různým přídavkem chitosanu: 0,000 % hm., 0,005 % hm. respektive 0,010 hm. %. Z grafu lze usuzovat, že připravené hydrogely disponují plně sesítovanou strukturou a to na základě faktu, že elastický modul převyšuje modul viskózní poměrně výrazně. Dále jsou také patrné výrazné rozdíly mezi hydrogely s přídavkem chitosanu a hydrogelem bez přídavku chitosanu. Přídavkem chitosanu dochází k nárůstu elastického modulu a naopak k poklesu modulu viskózního. Rozdíly mezi jednotlivými agarózovými hydrogely s přídavkem chitosanu nejsou příliš patrné, i z tohoto důvodu nebyly do grafu zahrnuty 0,001 % hm., 0,008 % hm. a 0,009 % hm. chitosanové hydrogely.



Obrázek 22: Frekvenční oscilační test pro 0,000 % hm., 0,005 % hm. a 0,010 % hm. chitosanový hydrogel (plná kolečka představují elastický modul, prázdná viskózní modul)

Druhou zkoumanou závislostí u frekvenčního testu byla frekvenční závislost ztrátového úhlu. Hodnota ztrátového úhlu, který je definován jako poměr viskózního a elastického modulu, udává míru viskoelasticity vzorku. Obrázek 23 zobrazuje frekvenční závislost ztrátového úhlu pro 0,000 % hm., 0,005 % hm. a 0,010 % hm. připravené chitosanové hydrogely. Dle definice ztrátového úhlu má ideálně elastický materiál hodnotu ztrátového úhlu $\delta = 0^\circ$ a ideálně viskózní látka $\delta = 90^\circ$. Na základě této definice je tedy patrné, že hydrogely s přidavkem chitosanu obsahují výraznou mírou elasticity a hydrogely bez přidavku chitosanu se chovají viskózněji.



Obrázek 23: Frekvenční závislost ztrátového úhlu pro 0,000 % hm., 0,005 % hm. a 0,010 % hm. chitosanový hydrogel

6.1.2 Stanovení velikosti pórů v hydrogelu

Velikost pórů u jednotlivých hydrogelů byla stanovována především proto, že úzce souvisí s difúzí. Čím větší velikost pórů, tím rychleji difúze probíhá. Pro každou koncentraci byly připraveny dva vzorky, ze kterých byla zprůměrována a vypočtena hodnota vlnového koeficientu. Vlnový koeficient odpovídá korelační délce dle obrázku 16 [39]. Korelační délka uvedená v mikrometrech je poté přímo úměrná velikosti pórů. Z níže uvedené tabulky je patrné, že s rostoucí koncentrací chitosanu lineárně roste velikost pórů připravených hydrogelů. Vzhledem k tomu, že se jedná o jednodušší metodu, nemusí být výsledky příliš přesné. Výsledky by bylo vhodné ověřit sofistikovanější metodou, tato metoda je však vhodná pro rychlé stanovení velikosti pórů.

Tabulka 7: Výsledky měření velikosti pórů

Koncentrace chitosanu [hm. %]	Vlnový exponent (WE)		Průměrná hodnota WE	Velikost pórů [μm]
0,000	-2,95	-3,02	-2,99	0,11
0,001	-2,84	-2,90	-2,87	0,15
0,009	-2,71	-2,74	-2,73	0,21
0,010	-2,51	-2,52	-2,52	0,50

6.2 Difúzní experimenty

Následující experimenty byly hlavní náplní této bakalářské práce. Reaktivita chitosanu byla studována metodou ustálené difúze v difúzní cele a metodou neustálené difúze v kyvetách. Faktorem ovlivňujícím difúzi byla koncentrace chitosanu, u neustálené difúze v kyvetách byl také zahrnut vliv výběru barviva, a to konkrétně jeho náboje a molekulové hmotnosti.

6.2.1 Difúzní experiment za účelem výběru vhodného anionaktivního barviva

Získané hodnoty absorbance, uvedené v tabulkách 8 a 9, byly srovnány a na jejich základě vybráno vhodné anionaktivní barvivo. Vybráno bylo barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250 na základě většího poklesu absorbance, který znamenal větší interakce mezi barvivem a biopolymerem.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty absorbance pro barvivo saturnová modř LBRR

Čas měření	Naměřená absorbance (poč. A = 1,038)					
	0,000 % hm. chit	0,000 % hm. chit	0,005 % hm. chit.	0,005 % hm. chit.	0,01 % hm. chit	0,01% hm. chit
24 h	0,970	1,005	0,627	0,676	0,628	0,603
48 h	0,956	0,958	0,500	0,526	0,576	0,572
72 h	0,924	0,959	0,450	0,500	0,654	0,614

Tabulka 9: Naměřené hodnoty absorbance pro barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250

Čas měření	Naměřená absorbance (poč. A = 1,102)					
	0,000 % hm. chit	0,000 % hm. chit	0,005 % hm. chit.	0,005 % hm. chit.	0,01 % hm. chit	0,01% hm. chit
24 h	0,839	0,882	0,504	0,575	0,698	0,559
48 h	0,724	0,800	0,423	0,526	0,750	0,644
72 h	0,694	0,795	0,352	0,434	0,744	0,612

6.2.2 Stanovení difúzního koeficientu metodou difúzních cel

Pilotní měření za účelem stanovení difúzního koeficientu byla prováděna metodou ustálené difúze v difúzních celách. Následně byla měření rozšířena o další metodu stanovení difúzního koeficientu, a to metodu neustálené difúze v kyvetách. Metoda neustálené difúze v kyvetách se jevila pro tyto měření lepší, a proto nahradila metodu ustálené difúze v difúzních celách.

Příprava měření a měření samotné probíhalo dle postupu, viz kapitola 5.4.2. Byla provedena pouze měření pro 1 % hm. agarózové hydrogely bez přídavku chitosanu. Za difúzní médium bylo zvoleno anionaktivní barvivo Coomassie Brilliant Blue, které se vyznačuje vyšší molekulovou hmotností, konkrétně 825,97 g/mol. Důsledkem vyšší molekulové hmotnosti barviva je především delší čas detekce barviva v přijímací cele, který se zde pohyboval okolo 26 hodin pro čistý agarózový gel bez přídavku chitosanu. Pro vzorky s přídavkem chitosanu by hodnoty času detekce byly mnohonásobně vyšší a z tohoto důvodu se poté přešlo na metodu neustálené difúze v kyvetách. V tabulce 10 jsou uvedeny výsledky.

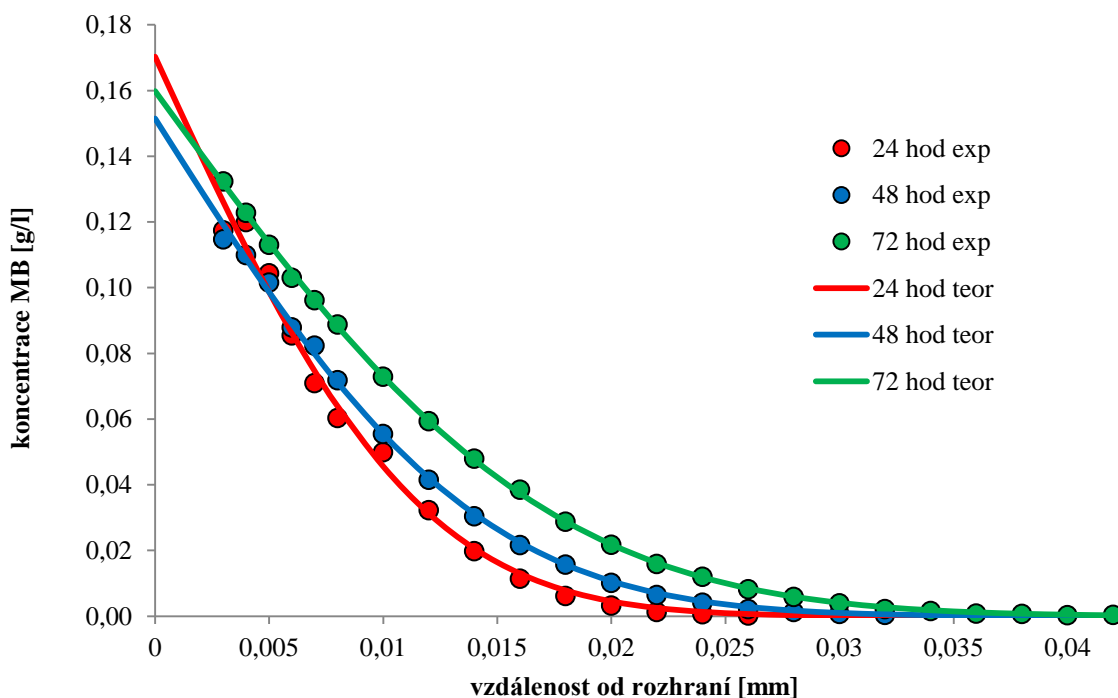
Tabulka 10: Vypočtené hodnoty difúzního koeficientu, času průchodu a absorbovaného množství barviva Coomassie Brilliant Blue pro 1 % hm. agarózové hydrogely

agaróza v gelu [hm. %]	D_{eff} [m ² ·s ⁻¹]	$t_{\text{průchod}}$ [h]	$c_{\text{barviva v gelu}}$ [mol·m ⁻³]
1	$4,91 \cdot 10^{-12}$	25,12	0,189
1	$6,80 \cdot 10^{-12}$	26,89	0,188

6.2.3 Stanovení difúzního koeficientu metodou neustálené difúze v kyvetách

Druhou metodou experimentálního stanovení difúzního koeficientu je metoda neustálené difúze v kyvetách. U této metody je hlavním předpokladem velký objem zdrojového roztoku barviva (v této bakalářské práci 250 ml). Dostatečný objem barviva je základním předpokladem pro zvolený difúzní model - během experimentu nesmí docházet ke změně koncentrace difúzního média. Z naměřených koncentrací prodifundovaného média do struktury agarózových gelů byly sestrojeny tzv. koncentrační profily, což je závislost koncentrace barviva na vzdálenosti od rozhraní hydrogel-roztok. Z koncentračních profilů difundující látky jsou následně stanoveny difúzní koeficienty. Postup měření je shrnut v kapitolách 5.4.3 a 5.4.4. Získaná data byla dále zpracovávána v programu MS Excel a Origin.

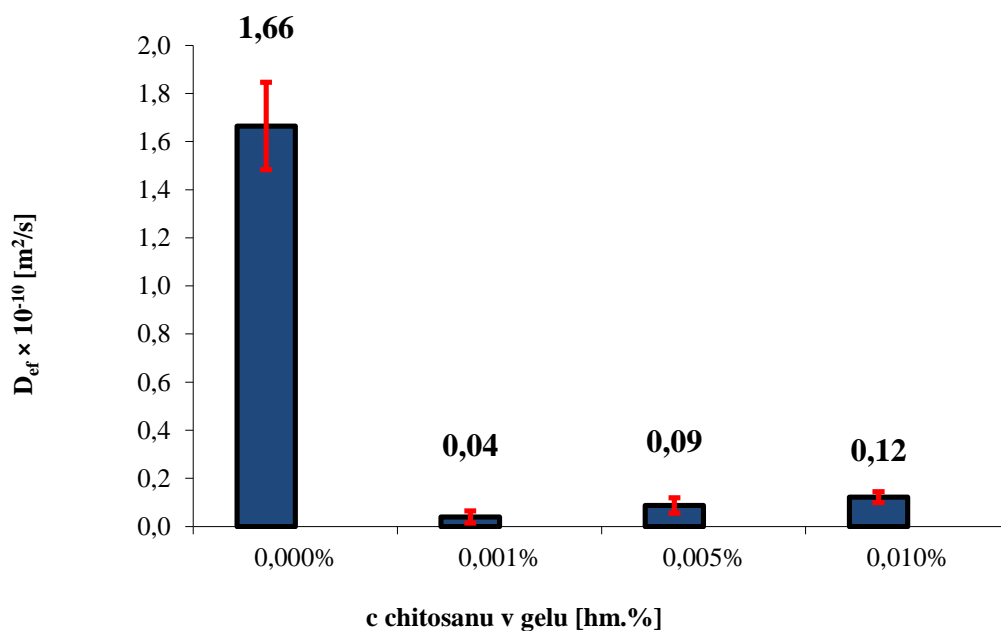
Za barvivo zdrojového roztoku bylo zvoleno anionaktivní barvivo Coomassie Brilliant Blue v případě prvním a v druhém případě kationaktivní methylenová modř. Tato barviva se liší nejen nábojem, ale je zde také poměrně výrazný rozdíl v jejich molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost barviva Coomassie Brilliant Blue má hodnotu 825,97 g·mol⁻¹, kdežto molekulová hmotnost methylenové modři je podstatně nižší, a to 319,85 g·mol⁻¹.



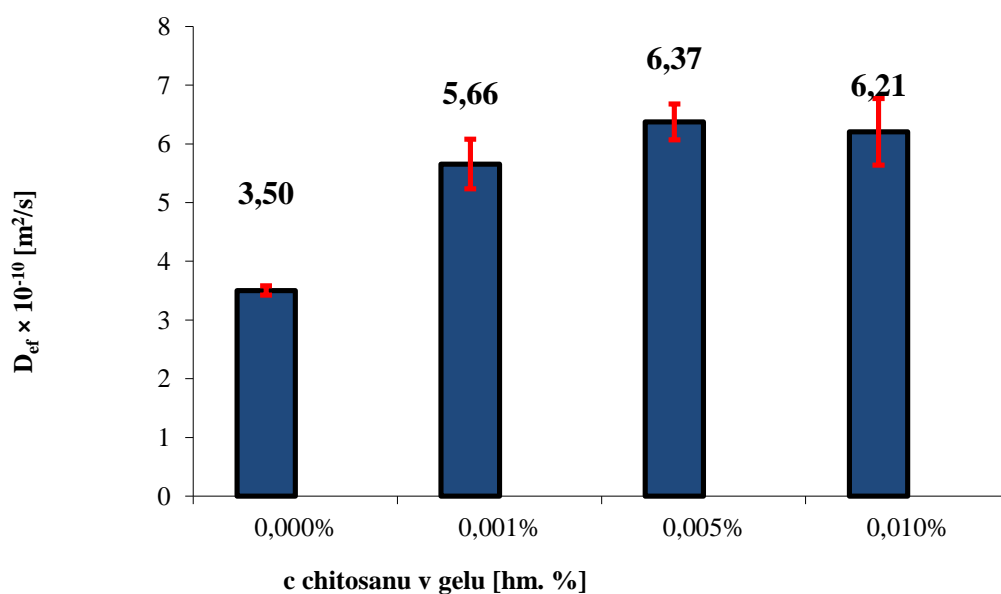
Obrázek 24: Koncentrační profil methylenové modři v agarózovém gelu bez přídavku chitosanu proložený teoretickou funkcí

Pomocí naměřených kalibračních křivek pro různé koncentrace barviva a chitosanu (viz tabulka 6) byly naměřené hodnoty absorbancí přepočteny na koncentrace. Na výše uvedeném grafu je zobrazena vypočtená koncentrace methylenové modři v různých polohách kyvety s různými koncentracemi chitosanu. Z takto získaných koncentračních profilů lze poté získat hodnoty efektivního difúzního koeficientu a hodnoty koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok, což jsou základní parametry charakterizující difúzní procesy. Parametry D_{eff} a koncentrace na rozhraní byly stanoveny metodou nejmenších čtverců pomocí nástroje Řešitel programu MS Excel.

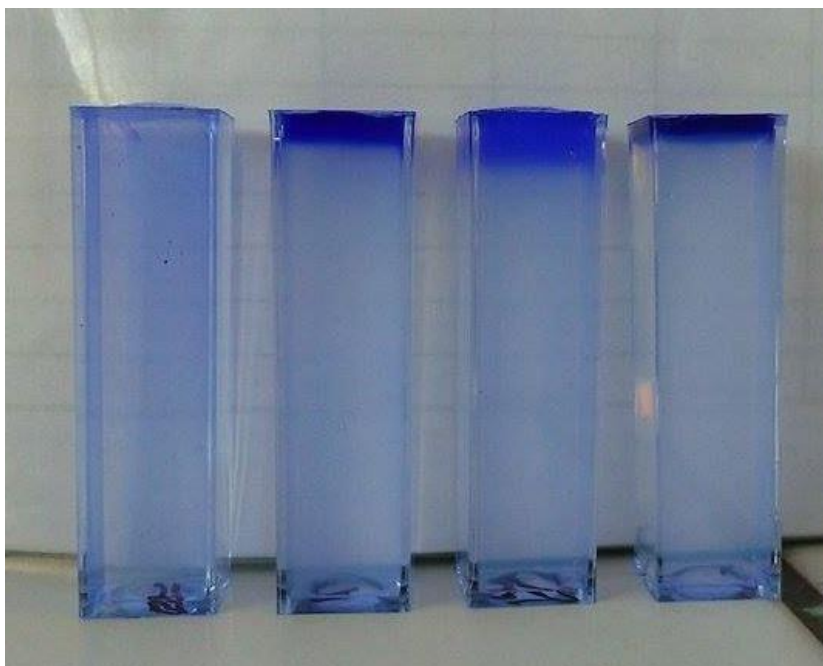
Na níže uvedených grafech jsou znázorněny závislosti efektivního difúzního koeficientu na hmotnostní koncentraci chitosanu. První graf znázorňuje závislost při použití barviva Coomassie Brilliant Blue, druhý graf při použití barviva methylenová modř. Z grafů je patrné, že vyjma 0,005 hm. % chitosanového hydrogelu, hodnota efektivního difúzního koeficientu s koncentrací chitosanu roste. Dále je patrné, že hodnoty difúzních koeficientů u barviva Coomassie Brilliant Blue jsou podstatně nižší než u barviva methylenová modř. Tyto rozdíly jsou způsobeny nejen rozdílnou molekulovou hmotností barviv, ale také interakcí barviva a chitosanu. U anionaktivního barviva Coomassie Brilliant Blue můžeme z hodnot difúzních koeficientů usuzovat, že zde dochází k poměrně silným chemickým interakcím mezi záporně nabitým barvivem a kladně nabitým chitosanem. Naopak u kationaktivního barviva methylenová modř se jedná o slabé vazebné interakce. Tyto interakce zpomalují difúzní proces. Z hodnot difúzních koeficientů čistých agarózových hydrogelů bez přídavku chitosanu je patrné, že difúzní koeficient barviva methylenová modř dosahuje téměř dvakrát větší hodnoty než u barviva Coomassie Brilliant Blue. Rozdíly v difúzi byly pozorovatelné i okem a jsou zobrazeny na obrázku 27.



Obrázek 25: Závislost efektivního difúzního koeficientu na koncentraci chitosanu v gelu, použité barvivo: Coomassie Brilliant Blue

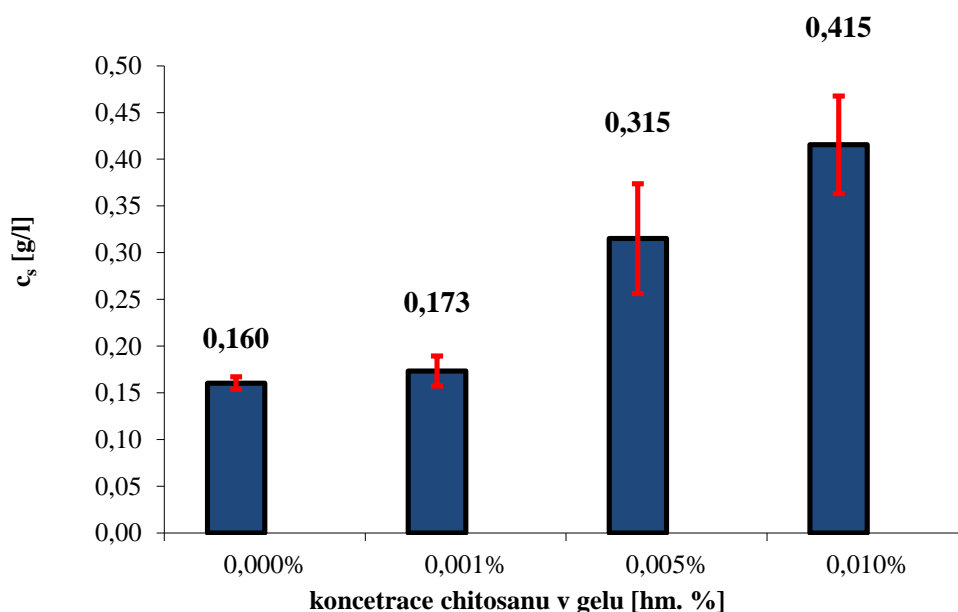


Obrázek 26: Závislost efektivního difúzního koeficientu na koncentraci chitosanu v gelu, použité barvivo: methylenová modř



Obrázek 27: Kyvety s agarózovým hydrogelem o různé koncentraci chitosanu po difúzi barviva Coomassie Brilliant Blue v čase 72 h

Následující graf znázorňuje grafickou závislost koncentrace použitého difúzního média na rozhraní hydrogel-roztok na hmotnostní koncentraci chitosanu v hydrogelu. Z grafu, viz obrázek 28, pro barvivo methylenová modř je patrné, že s rostoucí koncentrací chitosanu dochází k lineárnímu nárůstu koncentrace na rozhraní hydrogel-roztok. Dále je patrné, že u hydrogelů s přídavkem chitosanu je koncentrace na rozhraní vyšší než u čistého agarózového hydrogelu.



Obrázek 28: Závislost koncentrace barviva methylenová modř na obsahu chitosanu v hydrogelu

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium reaktivity kationaktivního biopolymeru chitosanu. Mezi hlavní výhody chitosanu patří jeho biokompatibilita a biodegradabilita, díky těmto vlastnostem nachází široké uplatnění v mnoha odvětvích. Reaktivita byla studována prostřednictvím dvou metod, a to ustálené difúze v difúzních celách a neustálené difúze v kyvetách.

Hlavními sledovanými parametry u metody neustálené difúze v kyvetách byly efektivní difúzní koeficient a koncentrace na rozhraní hydrogel-roztok, u metody ustálené difúze v difúzních celách to byl difúzní koeficient, čas průchodu barviva a koncentrace barviva v hydrogelu. V této práci byl studován vliv výběru barviva a koncentrace chitosanu na výše zmíněné parametry. Pilotní měření byla provedena prostřednictvím metody difúzních cel, poté se pokračovalo v měření metodou neustálené difúze v kyvetách. Experimentální část poté spočívala v měření absorbance v různých polohách od rozhraní hydrogel-roztok a následnému stanovení koncentračních profilů pro jednotlivé hydrogelové vzorky s různým obsahem chitosanu.

Experimentální část se také zabývala charakterizací agarózových hydrogelů obsahujících chitosan prostřednictvím jednoduchých fyzikálně-chemických metod, mezi které patří reologie a stanovení velikosti pórů. Z reologických měření vyplývá, že chitosan velmi výrazně ovlivňuje rigiditu hydrogelů. Hydrogely s přídavkem chitosanu disponují rigidnější strukturou a vyššími hodnotami viskoelastických modulů. Dále lze usuzovat, že připravené hydrogely disponují plně sesítovanou strukturou a to na základě faktu, že elastický modul převyšuje modul viskózní poměrně výrazně. Přídavkem chitosanu dochází k nárůstu elastického modulu a naopak k poklesu modulu viskózního. Z výsledků měření velikosti pórů pomocí UV-VIS spektrofotometrie vyplývá, že s rostoucí koncentrací chitosanu roste velikost pórů připravených hydrogelů.

U anionaktivního barviva Coomassie Brilliant Blue můžeme z hodnot difúzních koeficientů usuzovat, že zde dochází k poměrně silným chemickým interakcím mezi záporně nabitým barvivem a kladně nabitým chitosanem. Naopak u kationaktivního barviva methylenová modř se jedná o slabé vazebné interakce fyzikálního charakteru. Dále je patrné, že hodnoty difúzních koeficientů u barviva Coomassie Brilliant Blue jsou podstatně nižší než u barviva methylenová modř. Hodnota efektivního difúzního koeficientu u obou použitých barviv s koncentrací chitosanu roste. U druhého sledovaného parametru, tedy koncentrace na rozhraní hydrogel-roztok, je u barviva methylenová modř patrné, že s rostoucí koncentrací chitosanu dochází k lineárnímu nárůstu koncentrace na rozhraní hydrogel-roztok. Dále je u obou použitých barviv patrné, že u hydrogelů s přídavkem chitosanu je koncentrace na rozhraní vyšší než u čistých agarózových hydrogelů.

Difúzní techniky použité v této práci se jeví jako možný univerzální nástroj pro studium reaktivity biopolymerů. Studium reaktivity biopolymeru v hydrogelové formě přináší celou řadu výhod, mezi které patří například příprava vzorků o definované velikosti. Námětem dalšího studia by mohlo být porovnání chitosanů od různých výrobců, lišících se molekulovou

hmotností či stupněm deacetylace, a jejich vlivu na parametry sledované v této práci, případně studium vlivu dalších parametrů (teplota, iontová síla, atd.).

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. CÁRDENAS, Galo, Gustavo CABRERA, Edelio TABOADA a Marguerite RINAUDO. Synthesis and characterization of chitosan alkyl phosphate. *Journal of the Chilean Chemical Society* [online]. 2006, vol. 51, issue 1, s. 815-820. DOI: 10.4067/S0717-97072006000100011
2. SUN, Gang Zheng, Xi Guang CHEN, Jing ZHANG, Chao FENG a Xiao Jie CHENG. Adsorption characteristics of residual oil on amphiphilic chitosan derivative. *Water Science*. 2010, vol. 61, issue 9, s. 2363-2374. DOI: 10.2166/wst.2010.892.
3. KHOR, Eugene. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, vol. 6, issue 4, s. 313-317. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00002-5.
4. PETER, Martin G.: Chitin and chitosan from animal source. *Biopolymers*, vol. 6, *Polysaccharides II*, Edited by VANDAMME, E. J., BAETS S. De., STEINBÜCHEL, A., WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002. s. 481-574. ISBN 3-527-30227-1
5. FRANCO, Telma T., Martin G. PETER, Jing ZHANG, Chao FENG a Xiao Jie CHENG. Advances in chitin and chitosan research. *Polymer International*. 2011, vol. 60, issue 6, s. 873-874. DOI: 10.1002/pi.3111.
6. PENICHE, Hazel, Carlos PENICHE, Jing ZHANG, Chao FENG a Xiao Jie CHENG. Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polymer International*. 2011, vol. 60, issue 6, s. 883-889. DOI: 10.1002/pi.3056.
7. FU, Chun-Chong, Tien-Chieh HUNG, Chia-Hung SU, Devi SURYANI, Wen-Teng WU, Wei-Chen DAI a Yea-Tyam YEH. Immobilization of calcium oxide onto chitosan beads as a heterogeneous catalyst for biodiesel production: a contribution to nanomedicine. *Polymer International*. 2011, vol. 60, issue 6, s. 957-962. DOI: 10.1002/pi.3031.
8. UBHAYASEKERA, Wimal, Tien-Chieh HUNG, Chia-Hung SU, Devi SURYANI, Wen-Teng WU, Wei-Chen DAI a Yea-Tyam YEH. Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19: a contribution to nanomedicine. *Polymer International*. 2011, vol. 60, issue 6, s. 890-896. DOI: 10.1002/pi.3028.
9. KUMAR, Ravi, N. V. MAJETI. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000, vol. 46, issue 1, s. 1-27. DOI: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
10. DODANE, Valérie, Vinod D. VILIVALAM, Edelio TABOADA a Marguerite RINAUDO. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science*. 1998, vol. 6, issue 1, s. 246-253. DOI: 10.1016/S1461-5347(98)00059-5. ISSN 14615347.
11. FAN, Jinyong, Yi SHANG, Yingjin YUAN a Jun YANG. Preparation and characterization of chitosan/galactosylated hyaluronic acid scaffolds for primary hepatocytes culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010, vol. 1, issue 21, s. 319-327. DOI: 10.1007/s10856-009-3833-y. ISSN 0957-4530.

12. VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009. ISSN 0009-2770.
13. University of Hamburg: *Botany online: Cell walls of Algae* [online]. 2013, poslední revize 4.9.2014 [cit. 2014-11-22]. Dostupné z: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/26d.htm>.
14. RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industria l.* 1984, vol. 23, issue 1, s. 17-21. DOI: 10.1021/i300013a004.
15. Vydavatelství VŠCHT Praha: *Termoreverzibilní gel* [online]. 2005, [cit. 2014-12-03]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/synereze.html
16. OSMAN, Mohamed E., Alan R. MENZIES, Beatriz Albo MARTIN, Peter A. WILLIAMS, Glyn O. PHILLIPS a Timothy C. BALDWIN. Characterization of gum arabic fractions obtained by anion-exchange chromatography. *Phytochemistry*. 1995, vol. 38, issue 2, s. 409-417. DOI: 10.1016/0031-9422(94)00645-A. ISSN 00319422.
17. STOKOLS, Shula, Jeff SAKAMOTO, Chris BRECKON, Todd HOLT, James WEISS, Mark H. TUSZYNSKI. Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration. *Tissue Engineering*. 2006, vol. 12, issue 10, s. 2777-2787. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2777.
18. MP Biomedicals, LLC: *MPbio* [online]. 2014, [cit. 2015-01-31]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=04821616>
19. *World of chemicals* [online]. 2014, [cit. 2014-12-06]. Dostupné z: <http://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemical-properties/direct-blue-71.html>
20. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-422-x.
21. CATTANI, I., H. ZHANG, G. M. BEONE, A. A. M. DEL RE, R. BOCCELLI a M. TREVISAN. The Role of Natural Purified Humic Acids in Modifying Mercury Accessibility in Water and Soil. *Journal of Environment Quality*. 2009, vol. 38, issue 2, s. 493-501. DOI: 10.2134/jeq2008.0175.
22. SEDLÁČEK, Petr. *Reologie gelů – stručný přehled*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 34 s.
23. BARTOVSKÁ, Lidmila, Marie ŠÍŠKOVÁ: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 4. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 192 s. ISBN 80-7080-475-0.
24. DOJČANSKÝ, Ján, Jaroslav LONGAUER. *Chemické inžinierstvo II: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2000. 392 s. ISBN 80-967-0648-9.
25. CUSSLER, Edward. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. 3. vyd. New York: Cambridge University Press, 2009. 631 s. ISBN 05-218-7121-2.
26. CRANK, John.: *The Mathematics of Diffusion*. 2. vyd. Oxford: Claredon Press 1975

27. GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. et al.: Overview of laboratory methods employed for obtaining diffusion coefficients in FEBEX compacted bentonite. *Journal of Iberian Geology*. 2006, vol. 32, issue 1, p. 37-53. ISSN: 1698-6180
28. HLAVÁČ, Jan. *Základy technologie silikátů*. 2. vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, n. p, 1988.
29. KOTINGOVÁ, Lenka, Lenka BROSKÁ a Zdeněk FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chemické listy*. vol. 103, issue 7, s. 533-539.
30. Vydavatelství VŠCHT Praha: *Struktura gelu* [online]. 2005, [cit. 2014-12-11]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/figures/reverzibilni_gel.2.jpg
31. *Guide to rheology*. [online]. [cit. 2014-12-23]. Dostupné z: <http://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/SP946/node14.htm>
32. DRAGAN, Ecaterina Stela, Maria Marinela PERJU a Maria Valentina DINU. Preparation and characterization of IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and chitosan and their interaction with ionic dyes. *Carbohydrate Polymers*. 2012, vol. 88, issue 1, s. 270-281. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.12.002.
33. CHATTERJEE, Sudipta, Tania CHATTERJEE a Seung H. WOO. A new type of chitosan hydrogel sorbent generated by anionic surfactant gelation. *Bioresource Technology*. 2010, vol. 101, issue 11, s. 3853-3858. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.089.
34. FALK, B., S. GARRAMONE a S. SHIVKUMAR. Diffusion coefficient of paracetamol in a chitosan hydrogel. *Materials Letters*. 2004, vol. 58, issue 26, s. 3261-3265. DOI: 10.1016/j.matlet.2004.05.072.
35. PA, Jeng Hsan, T. LEON YU. Light Scattering Study of Chitosan in Acetic Acid Aqueous Solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2001, Vol. 202, s. 985-991.
36. IBRAHIM, Rania a Gerald B. KASTING. Partitioning and diffusion of parathion in human dermis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, vol. 435, issue 1, s. 33-37. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.023.
37. GUTENWIK, Jan, Bernt NILSSON a Anders AXELSSON. Determination of protein diffusion coefficients in agarose gel with a diffusion cell. *Biochemical Engineering Journal*. 2004, vol. 19, issue 1, s. 1-7. DOI: 10.1016/j.bej.2003.09.004.
38. NARAYANAN, Jaaky, Jun-Ying XIONG a Xiang-Yang LIU. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics: Conference Series*. 2006, vol. 28, issue 1, s. 83-86. DOI: 10.1088/1742-6596/28/1/017.
39. AYMARD, Pierre, David R. MARTIN, Kevin PLUCKNETT, Tim J. FOSTER, Allan H. CLARK, Ian T. NORTON. Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels. *Biopolymers*. 2001, vol. 59, issue 3, s. 131-144.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Použité zkratky

<i>Zkratka</i>	<i>Význam zkratky</i>
IČ	infračervená spektroskopie
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
GlcNAc	N-acetylglukosaminová jednotka
GlcN	glukosaminová jednotka
F _A	stupeň acetylce
DA	stupeň acetylce
DD	stupeň deacetylce
C.I.	barevný index
INN	methylthioninium-chlorid
LBRR	Saturnová modř
LVO	oblast lineární viskoelastivity
s-IPN	semipenetrující polymerní síť
d-IPN	plně penetrující polymerní síť
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
CSB	chitosanové perly
SDS	dodecylsulfát sodný
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
BSA	hovězí sérový albumin
DLS	dynamický rozptyl světla
WE	vlnový exponent

9.2 Použité symboly

<i>symbol</i>	<i>význam</i>	<i>jednotka</i>
T	čas	[s]
M	chemický potenciál	[J·mol ⁻¹]
X	vzdálenost, prostorová souřadnice	[m]
P	tlak	[Pa]
T	teplota	[K]
F	síla	[N]
V	objem	[m ³]
A	plocha	[m ²]
λ	vlnová délka	[nm]
λ_{max}	vlnová délka při nejvyšší hodnotě absorpance	[nm]
J_i	difúzní tok	[mol·s ⁻¹]
j_i	difúzní tok přes jednotkovou plochu	[mol·m ⁻² ·s ⁻¹]
D	difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
D_{eff}	efektivní difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
B	konstanta aparatury	[m ⁻²]
C	molární koncentrace	[mol·m ⁻³]
$c_{l\infty}$	původní koncentrace v difúzní cele	[mol·m ⁻³]
c_r	konečná koncentrace na rozhraní	[mol·m ⁻³]
η^*	komplexní viskozita	[Pa·s]
G'	elastický modul	[Pa]
G''	viskózní modul	[Pa]
Δ	ztrátový úhel	[°]
F	frekvence	[Hz]
A	absorbance	
Γ	amplituda napětí	[%]

R^2	koeficient spolehlivosti	
W	hmotnostní koncentrace	[hm. %]
c_s	koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok	[g·dm ⁻³]
E	rozdělovací koeficient	
W	práce vykonaná systémem	[J]
N	látkové množství	[mol]